



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Diversidad genética y estructura poblacional de seis  
especies de caracoles comestibles (*Megalobulimus*)  
endémicos de la Amazonía revelada por marcadores  
ISSR**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga**

**AUTOR**

**Paola Janet AGUIRRE RUELAS**

**ASESOR**

**Rina Lastenia RAMÍREZ MESÍAS**

**Lima, Perú**

**2018**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Aguirre P. Diversidad genética y estructura poblacional de seis especies de caracoles comestibles (*Megalobulimus*) endémicos de la Amazonía revelada por marcadores ISSR [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología; 2018.

---



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**


Siendo las 17:10 horas del 12 de noviembre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **PAOLA JANET AGUIRRE RUELAS**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 016-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: **"DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE SEIS ESPECIES DE CARACOLES COMESTIBLES (*MEGALOBULIMUS*) ENDÉMICOS DE LA AMAZONÍA REVELADA POR MARCADORES ISSR"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: aprobada con mención honrosa.

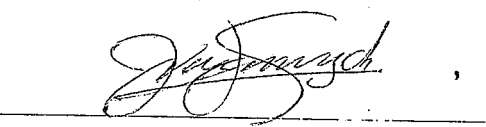
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **PAOLA JANET AGUIRRE RUELAS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

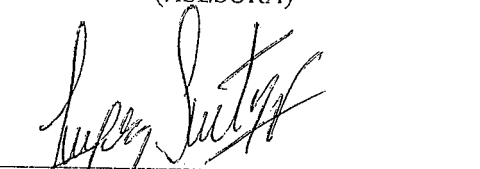
Siendo las 18:31 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 12 de noviembre de 2018.

  
Dr. DAN VIVAS RUIZ  
(PRESIDENTE)

  
Dra. RINA RAMÍREZ MESIAS  
(ASESORA)

  
Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA  
(MIEMBRO)

  
Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR  
(MIEMBRO)

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, quienes siempre me apoyaron y alentaron a llevar a cabo mis metas, a mis padres por animar siempre mi curiosidad sobre el funcionamiento de las cosas.

Al Bach. Jaime Morín, quien con paciencia me ha apoyado en distintas maneras a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A mi querida asesora, la Dra. Rina Ramírez, que con su ejemplo de trabajo duro nos inspira a todos en el laboratorio a dar todo nuestro esfuerzo.

A Víctor Jiménez, el mejor amigo, mentor, consejero, que tengo la suerte de conocer, quien siempre me ha escuchado y brindado sus sabios consejos académicos y sobre la vida.

A María Solís, Diana Cubas, Thalía Silvestre, Fátima Rivera, amigas del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, por los buenos momentos en el laboratorio y el apoyo en el cuidado de los caracoles vivos.

A los investigadores que depositaron material *Megalobulimus* en la colección del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, sin ellos no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A mi alma mater, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a la cual estaré siempre agradecida por prepararme y exigirme.

Finalmente agradezco al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado por financiar mediante fondos concursable la presente tesis, UNMSM-VRIP Proyecto Código N° B17100044b, lo cual permitió el desarrollo de la mayor parte de la presente tesis.

¡A todos, muchas gracias!

## INDICE

INDICE DE TABLAS .....	iii
INDICE DE FIGURAS .....	v
ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	7
2.1. Importancia de los caracoles <i>Megalobulimus</i> como recurso genético para el Perú.....	7
<i>Potencial gastronómico</i> .....	7
<i>Potencial medicinal</i> .....	9
<i>Importancia ornamental</i> .....	9
<i>Importancia ecológica y modelo de estudio evolutivo</i> .....	10
2.2. El Perú como fuente de endemismo de moluscos de tierra, y la distribución de <i>Megalobulimus</i> . ....	11
2.3. Problemática del género <i>Megalobulimus</i> .....	15
2.4. Estudios moleculares y filogenia de las especies del género <i>Megalobulimus</i> .....	18
2.5. ISSR como marcador de alta resolución para el estudio de especies y poblaciones .....	24
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos .....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
5.1 Material biológico .....	31
<i>Megalobulimus capillaceus</i> .....	33
<i>Megalobulimus florezi</i> .....	37
<i>Megalobulimus popelairianus sensu lato</i> (incluye a ' <i>M. thammianus</i> ') .....	39
<i>Megalobulimus carrikeri</i> y <i>M. lichtensteini</i> .....	44
5.2. Extracción del ADN .....	52
<i>Cuantificación del ADN y concentración de trabajo</i> .....	53
5.3. Estandarización de protocolos de amplificación de ADN y electroforesis .....	55
5.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	56
5.3.2. Visualización de los perfiles ISSR .....	59

5.4.	Secuenciamiento del ADN .....	60
5.5.	Análisis molecular .....	61
	<i>Análisis de las secuencias de ADN</i> .....	61
	<i>Duplicación, aleatorización y reproducibilidad</i> .....	62
	<i>Construcción de matrices para cada marcador ISSR</i> .....	62
	<i>Evaluación de la calidad de los datos</i> .....	63
	<i>Estimación de la diversidad genética</i> .....	64
	<i>Construcción de dendogramas</i> .....	65
6.	RESULTADOS .....	67
6.1.	Estandarización de los protocolos moleculares .....	67
	<i>Extracción del ADN y concentración inicial de ADN genómico</i> .....	67
	<i>Amplificación por PCR con cebadores ISSR</i> .....	70
	<i>Visualización de perfiles ISSR mediante electroforesis</i> .....	75
6.2.	Comparación de perfiles ISSR entre distintas especies de <i>Megalobulimus</i> ..	77
6.3.	Perfiles ISSR en poblaciones de la especie <i>M. capillaceus</i> .....	85
6.4.	Perfiles ISSR en poblaciones de la especie <i>M. popelairianus sensu lato</i> .....	92
6.5.	Análisis de distancias genéticas entre especies de <i>Megalobulimus</i> .....	99
6.6.	Análisis de diversidad genética y estructura poblacional de <i>M. capillaceus</i>	107
6.6.1.	Elaboración de matrices de datos y evaluación de sitios informativos.	107
6.6.2.	Distancias genéticas entre poblaciones de <i>Megalobulimus capillaceus</i>	109
6.6.3.	Diferenciación poblacional de <i>M. capillaceus</i> .....	111
6.7.	Análisis de diversidad genética en <i>M. popelairianus sensu lato</i> .....	113
6.7.1.	Elaboración de matrices de datos y evaluación de sitios informativos.	113
6.7.2.	Distancias genéticas en <i>Megalobulimus popelairianus sensu lato</i> .....	115
6.7.3.	Diferenciación en <i>M. popelairianus sensu lato</i> .....	118
7.	DISCUSIÓN .....	120
7.1.	ISSR como evidencia molecular de las variaciones morfológicas .....	120
	<i>Poder de resolución de las bandas (Rp)</i> .....	122
	<i>Contenido de Información Polimórfica (PIC)</i> .....	123
	<i>Reproducibilidad de la técnica</i> .....	124
	<i>Puntuación de bandas</i> .....	125
7.3	Diversidad intraespecífica encontrada en <i>M. capillaceus</i> .....	126
7.4	Diversidad genética encontrada en <i>M. popelairianus sensu lato</i> .....	127
7.5.	Diversidad genética encontrada en el género <i>Megalobulimus</i> .....	130
	<i>Divergencia entre M. capillaceus y M. florezi</i> .....	132
8.	CONCLUSIONES .....	134
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	137
11.	ANEXOS Y GLOSARIO .....	145

## INDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1    Algunas diferencias morfológicas entre <i>M. popelairianus</i> y ' <i>M. thammianus</i> ' encontradas a partir de la descripción de Martens (1876) y de Borda et al. (2010).	17
Tabla 2    Algunas aplicaciones de los ISSR en el estudio de la biodiversidad.	27
Tabla 3    Estudios en moluscos que implementan la técnica ISSR.	28
Tabla 4    Zonas de muestreo, donde se colectaron poblaciones de <i>M. capillaceus</i> .	35
Tabla 5    Coordenadas de colecta de los individuos de <i>Megalobulimus</i> , codificación, procedencia y colectores.	46
Tabla 6    Nombres y secuencias de los cebadores ( <i>primers</i> ) ISSR incluidos en el análisis.	57
Tabla 7    Cuantificación de ADN de las muestras trabajadas. Cuantificación realizada antes y después de las diluciones.	69
Tabla 8    Condiciones finales de la mezcla de PCR estandarizada en este estudio.	71
Tabla 9    Ciclaje estandarizado para las reacciones de PCR en cada marcador ISSR, usando la <i>Taq polimerase</i>	74
Tabla 10   Marcadores ISSR seleccionados para analizar todas las especies.	75
Tabla 11   Datos de los ISSR de las 6 especies analizadas de <i>Megalobulimus</i> . Cálculos hechos en Excel. Los valores más altos se encuentran resaltados en negrita.	99
Tabla 12   Patrones de bandas totales para cada especie de <i>Megalobulimus</i> .	100
Tabla 13   Análisis de los sitios polimórficos en las poblaciones de <i>Megalobulimus</i> , 166 sitios en total. Análisis realizados en DNAsp.	101
Tabla 14   Diversidad genética en seis especies de <i>Megalobulimus</i> , obtenida mediante el software GenAlEx 6.5.	101
Tabla 15   Distancias intraespecíficas promedio de <i>Megalobulimus spp.</i>	102



Tabla 16	Análisis de distancias entre especies. Cálculos hechos con Mega7	103
Tabla 17	Diferenciación genética entre especies de <i>Megalobulimus</i> mediante estadísticos G <sub>st</sub> y F <sub>st</sub> .	104
Tabla 18	Distancia genética de Nei, evaluada para cinco especies de <i>Megalobulimus</i> usando el software GenAEx 6.5.	106
Tabla 19	Datos observados respecto a las bandas generadas por los cebadores ISSR. Los valores en negrita señalan los valores más altos.	108
Tabla 20	Patrones de bandas totales para cada población de <i>M. capillaceus</i> .	108
Tabla 21	Diversidad genética en seis especies de <i>Megalobulimus</i> , obtenida mediante el software GenAEx 6.5.	109
Tabla 22	Identidad genética de Nei, generada para cinco poblaciones de <i>M. capillaceus</i> usando el software GenAEx 6.5.	110
Tabla 23	Distancia genética de Nei, evaluada para cinco poblaciones de <i>M. capillaceus</i> usando el software GenAEx 6.5.	110
Tabla 24	Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las accesiones de <i>M. capillaceus</i> .	111
Tabla 25	Datos de los ISSR de 11 individuos analizados de <i>M. popelairianus sensu lato</i> . Cálculos hechos en Excel.	113
Tabla 26	Patrones de bandas totales para cada población de <i>M. popelairianus</i> .	114
Tabla 27	Diversidad genética en los individuos de <i>M. popelairianus sensu lato</i> .	115
Tabla 28	Identidad genética de Nei, generada para 4 poblaciones de <i>M. popelairianus s. l.</i> , usando el software GenAEx 6.5.	116
Tabla 29	Datos de los ISSR de las 6 especies analizadas de <i>Megalobulimus</i> . Cálculos hechos en Excel.	116
Tabla 30	Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las accesiones de <i>M. popelairianus</i> .	117
Tabla 31	Análisis de distancias entre los grupos definidos de <i>M. popelairianus s.l.</i> Resultados obtenidos con Mega 7.	117
Tabla 32	Análisis de distancias entre <i>M. popelairianus</i> y las poblaciones de ' <i>M. thammianus</i> '. Resultados obtenidos con Mega 7.	119

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Distribución geográfica de especies del género <i>Megalobulimus</i> (Strophocheilidae) con distribución en la Amazonia. Tomado de Ramírez <i>et al.</i> , 2012. 15
Figura 2	Conchas de <i>Megalobulimus</i> procedentes de Perú. (A) <i>M. capillaceus</i> (Dpto. San Martín). (B) <i>M. carrikeri</i> (Dpto. Junín). (C) <i>M. lichtensteini</i> (Dpto. Amazonas). (D) <i>M. huascari</i> (Dpto. Junín). (E) ' <i>M. thammianus</i> (Dpto. Junín). (F) <i>M. popelairianus</i> (Dpto. Madre de Dios). Editado de Ramírez <i>et al.</i> 2012 21
Figura 3	Árbol bayesiano de siete especies de <i>Megalobulimus</i> de la Amazonia occidental, basado en un segmento del gen mitocondrial 16S rRNA. Tomado de Ramírez <i>et al.</i> 2012 22
Figura 4	Conchillas de <i>Megalobulimus capillaceus</i> provenientes de Huingoyacu, Prov. Bellavista, Departamento de San Martín. Códigos W30 (A) y W31 (B). 34
Figura 5	Individuo preservado de <i>Megalobulimus capillaceus</i> proveniente de Tingo María, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco. Código W56. 34
Figura 6	Individuos vivos de <i>Megalobulimus capillaceus</i> provenientes del distrito de Juan Guerra, Prov. San Martín, Departamento de San Martín. Códigos W35 (A) y W34 (B). 35
Figura 7	Localización en el mapa de los puntos de colecta de las diferentes poblaciones de <i>Megalobulimus capillaceus</i> . 36
Figura 8	Individuo preservado de <i>Megalobulimus florezi</i> proveniente del distrito de Echarate, Prov. La convención, Departamento de Cuzco. Código X36. Foto en tres vistas diferentes. 38
Figura 9	Individuo vivo y conchillas, asignados como <i>Megalobulimus popelairianus</i> provenientes del distrito de Juan Guerra, Prov. San Martín, Departamento de San Martín. Códigos W28 (A y B) y W53 (C). Fotografía en tres vistas diferentes. 40
Figura 10	Individuo preservado de <i>Megalobulimus popelairianus</i> proveniente del distrito de Buenos Aires, Prov. Picota, Departamento de San Martín. Código T29. 41
Figura 11	Comparación de individuos vivos asignados como <i>Megalobulimus popelairianus s.l.</i> provenientes de los distritos de Juan Guerra y San Cristóbal, Prov. Picota, Departamento de San Martín. 42

Figura 12	Localización en el mapa de los puntos de colecta de las diferentes poblaciones de <i>Megalobulimus popelairianus</i> que entraron en nuestros análisis.	43
Figura 13	Fotografía de individuo preservado de <i>Megalobulimus carrikeri</i>	44
Figura 14	Conchillas de <i>Megalobulimus lichtensteini</i> provenientes de Chanchamayo.	45
Figura 15	Mapa global que muestra la localización de todos los individuos colectados <i>Megalobulimus</i> muestreadas.	51
Figura 16	Proceso recomendado en flujo de caja para experimentos de genotipado con ISSR. Adaptado de Ng y Tang (2015).	55
Figura 17	Anotación de bandas para la creación de matriz binaria. Adaptado de Tan y Ng (2015).	63
Figura 18	Electroforesis de ADN genómico de individuos preservados. Gel de agarosa 1% (95V, 22 min).	68
Figura 19	Ensayo de condiciones de MgCl <sub>2</sub> y temperatura mediante el marcador ISSR UBC 810.	72
Figura 20	La temperatura óptima de hibridación del marcador UBC 810 fue 54 °C ya que se evidenciaron más bandas a la vez que mostraron más nitidez, el mismo fenómeno se observó con el resto de cebadores que finalmente fueron empleados en los análisis. Muestra A corresponde a un individuo de <i>M. carrikeri</i> y muestra B a un individuo de <i>M. popelairianus</i> .	73
Figura 21	Resolución de las bandas ISSR comparadas en diferentes tiempos de electroforesis, para la población de Tingo María de <i>Megalobulimus capillaceus</i> empleando el marcador UBC 825.	76
Figura 22	Perfiles de ISSR de las seis especies <i>Megalobulimus</i> obtenidos a partir del marcador SAS 1.	78
Figura 23	Perfiles de ISSR para las seis especies <i>Megalobulimus</i> obtenidos a partir del marcador SAS 3.	79
Figura 24	Perfiles de ISSR de las seis especies <i>Megalobulimus</i> obtenidos a partir del marcador UBC 811.	80
Figura 25	Perfiles de ISSR de las seis especies <i>Megalobulimus</i> obtenidos a partir del marcador UBC 823.	81
Figura 26	Perfiles de ISSR de las seis especies <i>Megalobulimus</i> obtenidos a partir del marcador UBC 825.	82

Figura 27	Perfiles de ISSR de las seis especies <i>Megalobulimus</i> obtenidos a partir del marcador UBC 840. Marcador de tamaño molecular (L).	83
Figura 28	Patrones ISSR obtenidos con el cebador UBC 825. Marcador de tamaño molecular (Thermo Scientific #SM1331). Esta fotografía representa el primer ensayo de ISSR obtenido en <i>M. florezi</i> y <i>M. capillaceus</i> , evidenciando claramente dos grupos marcados que no fueron discriminados por marcadores de secuencia. El tiempo de corrida fue mayor al de los ensayos incluidos en los análisis bioinformáticos.	84
Figura 29	Perfiles ISSR de <i>M. capillaceus</i> procedentes de siete localidades, empleando el marcador UBC 823. Se encontraron en total 9 posiciones de bandas.	86
Figura 30	Perfiles ISSR de <i>M. capillaceus</i> procedentes de seis localidades. Empleando el marcador SAS 1, se encontraron en total 23 posiciones de bandas.	87
Figura 31	Perfiles ISSR de <i>M. capillaceus</i> provenientes de siete localidades, empleando el marcador SAS 3. Se encontraron en total 22 posiciones de bandas. Esta fotografía que fue tomada a los 40 minutos de corrida fue la que presentó mejor resolución. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.	88
Figura 32	Perfiles ISSR de <i>M. capillaceus</i> provenientes de siete localidades, empleando el marcador UBC 825. Se encontraron en total 18 posiciones de bandas.	89
Figura 33	Perfiles de ISSR de <i>M. capillaceus</i> precedentes de siete localidades empleando el marcador UBC 811. Se encontraron en total 17 posiciones de bandas.	90
Figura 34	Perfiles de ISSR de <i>M. capillaceus</i> provenientes de siete localidades empleando el marcador UBC 840. Se encontraron en total 15 posiciones de bandas.	91
Figura 35	Perfiles de ISSR de <i>M. popelairianus</i> procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador SAS 1, se encontraron en total 13 posiciones de bandas.	93
Figura 36	Perfiles de ISSR de <i>M. popelairianus</i> procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador SAS 3, se encontraron en total 13 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de <i>M. capillaceus</i> como referencia.	94

Figura 37	Perfiles de ISSR de <i>M. popelairianus</i> procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 823, se encontraron en total 11 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de <i>M. capillaceus</i> como referencia.	95
Figura 38	Perfiles de ISSR de <i>M. popelairianus</i> procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 825, se encontraron en total 12 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de <i>M. capillaceus</i> como referencia.	96
Figura 39	Perfiles de ISSR de <i>M. popelairianus</i> procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 811, se encontraron en total 10 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de <i>M. capillaceus</i> como referencia.	97
Figura 40	Perfiles de ISSR de <i>M. popelairianus</i> procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 840, se encontraron en total 13 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de <i>M. capillaceus</i> como referencia.	98
Figura 41	Agrupamiento de las especies <i>Megalobulimus</i> en base al algoritmo UPGMA.	106
Figura 42	Dendograma muestra el agrupamiento de las poblaciones de <i>M. capillaceus</i> , obtenido mediante el método UPGMA en el software Mega7.	112
Figura 43	Relaciones entre las poblaciones de <i>M. popelairianus sensu lato</i> , usando el algoritmo UPGMA (1000 <i>Bootstrap</i> ) implementado en Mega 7.	118

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)
AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
com. per.	comunicación personal
CTAB	<i>Cetyl trimethyl ammonium bromide</i> (bromuro de cetiltrimetilamonio)
dNTP	Mezcla de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
EDTA	<i>Etilen Diamino Tetra Acetic Acid</i> (ácido etilendiamino tetraacético)
F <sub>ST</sub>	Diferenciación génica entre todas las poblaciones
G <sub>ST</sub>	Diferenciación genética poblacional
ISSR	<i>Interspread Single Sequence Repeats</i> (Polimorfismo de repetición entre secuencias simple (microsatelites))
MHN	Museo de Historia Natural
m s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
ng	Nanogramo
pb	pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
r.p.m.	revoluciones por minuto
UBC	University of British Columbia
TBE	<i>Tris Borate EDTA buffer</i> (Tampón de electroforesis Tris Borato EDTA)
µg	Microgramo
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos

## RESUMEN

Los caracteres morfológicos han sido tradicionalmente la clave para clasificar y distinguir a los seres vivos, en los últimos años la adición de herramientas moleculares ha logrado precisar y afinar aún más la identificación de los organismos. Sin embargo, en algunos grupos se ha observado que los marcadores de secuencia llegan al límite de resolución impidiendo una clara distinción entre taxa, como es el caso para algunas especies de moluscos terrestres del género *Megalobulimus* que no presentan claridad de discriminación al ser analizadas mediante marcadores de secuencias. Siendo éste un recurso de interés comercial para el Perú, la importancia de discernir correctamente estas especies y reconstruir sus relaciones filogenéticas ahonda más allá del tema académico, ya que aporta a su correcto aprovechamiento y a la protección de la biodiversidad del país, por lo que se propone emplear marcadores altamente polimórficos como los ISSR en este género.

Se utilizaron 69 individuos pertenientes a seis taxa, de 12 provincias y seis regiones del Perú. Se evaluaron 13 marcadores del tipo ISSR, de los cuales seis resultaron muy variables (SAS1 fue el más variable). Para dar soporte a la reproducibilidad de la técnica y confiabilidad de los resultados, todos los procedimientos fueron ejecutados por duplicado con el 10% de las muestras, obteniendo el mismo resultado.

En el análisis interespecífico de *Megalobulimus* se obtuvieron 166 sitios informativos, con un valor PIC (Contenido de Información Polimórfica) de 0.36 a 0.46 y valores de Rp (Poder de resolución de las bandas) de 9.6 a 23.1 discriminando fehacientemente a seis especies.

Las especies *M. capillaceus* y *M. florezi* no son discriminables con marcadores de secuencia clásicos (COI, 16S rRNA), sin embargo, mostraron perfiles electroforéticos claramente diferenciables, soportado por valores estadísticos. En *M. popelairianus sensu lato* se revelaron dos perfiles quedando inequívocamente discriminada la variedad '*thammianus*' de la especie *M. popelairianus*, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Si bien Martens (1876) reportó a '*thammianus*' como una variación de *M. popelairianus*, las diferencias encontradas entre los perfiles ISSR de estos dos grupos es comparable a lo encontrado entre otras especies del género como *M. carrikeri* y *M. lichtensteini* diferenciables tanto morfológicamente como con marcadores de secuencia.

**Palabras clave:**

ISSR, *Megalobulimus*, caracoles terrestres, diferenciación genética, estructura poblacional, marcador dominante.



## ABSTRACT

Morphological characters have traditionally been the key to correctly classify and identify organisms, the addition of molecular biology tools has been able to further and more precisely define taxonomic keys. However, it has been observed that sequence markers arrive at the limit of resolution in some groups of animals such as the case of the land snail of genus *Megalobulimus*, making the molecular characterization of its species difficult as well as the reconstruction of their phylogenetic relationships. The importance of discriminating species of this genus is beyond of an academic issue, but also a matter of economic-commercial importance in Peru, as well as to the protection of its biodiversity.

A total of 69 individuals from six taxa, belonging to 12 provinces and 6 regions of Perú were used. 13 ISSR primers were evaluated, resulting six of them with high levels of polymorphism (SAS 1 was the most variable). All experimental procedures were run in duplicate with 10% of the samples, obtaining the same results, which supports the reproducibility of the technique and reliability of the outcomes.

In the interspecific analysis of *Megalobulimus*, 166 informative sites were obtained, and the PIC (Polymorphic Information Content) values for the primers used had a range of 0.36 to 0.46 and the Resolution Power values of the bands (RP) ranged from 9.6 to 23.1 clearly discriminating to six species.

The species *M. capillaceus* and *M. florezi* are not discriminable with classical sequence markers (COI, 16S rRNA), however, they showed clear differentiable electrophoretic profiles, supported by statistical values. Likewise, *M. popelairianus sensu lato* revealed two profiles, the variety '*thammianus*' was

unequivocally discriminated against from the species *M. popelairianus*. Although Martens (1876) reported to '*thammianus*' as a variation of the species *M. popelairianus*, the differences between the ISSR profiles of these two groups are comparable to that found among other recognized species of the genus such as *M. carrikeri* and *M. lichtensteini* differentiable both morphologically and with sequence markers.

**Keywords:** ISSR, *Megalobulimus*, land snails, population structure, genetic differentiation, dominant marker.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las cosas más sorprendentes de la naturaleza es su diversidad y la capacidad de generar nuevas formas de vida que respondan al medio. Durante más de un siglo, los biólogos evolutivos han intentado comprender los mecanismos e interacciones que subyacen a tanta variedad de formas, tamaños y colores encontrados en la flora y fauna terrestre. La mayor parte de esta diversidad de especies se concentra sobre zonas tropicales y subtropicales, especialmente los Andes, identificado por Myers *et al.* (2000) como uno de los 25 *hotspots* de biodiversidad en el mundo, albergando el mayor número de especies endémicas de plantas (20,000), aves (677) y anfibios (604) del mundo (Brooks *et al.*, 2002).

Paradójicamente, la biodiversidad en estas áreas se encuentra amenazada por la significativa pérdida y degradación de hábitats debido al cambio climático y la actividad humana (agricultura, el crecimiento urbano, la minería de superficie, la extracción de minerales, las operaciones de tala y quema). En adición, los Andes tropicales, se encuentran entre los cinco *hotspots* más sensibles a la pérdida de hábitat, la estimación hecha por Brooks *et al.* (2002) del número total de especies que quedarían si se perdiera un hábitat de 1000 km<sup>2</sup>, predice que este *hotspot* (siendo el más sensible) perdería la mayoría de sus especies de plantas y vertebrados. Esta reducción del hábitat merma el potencial evolutivo de las poblaciones debido a la reducción del número de individuos y de su diversidad genética (Nei *et al.*, 1975).

El Perú no es la excepción, dentro de su riqueza biológica comprende flora y fauna endémica, muchas de ellas con interesantes propiedades para el

biocomercio, como lo son los caracoles de tierra, los cuales se ven amenazados por la reducción de su hábitat y explotación humana. Los *Megalobulimus* Miller, 1878 son el único género de la familia Strophocheilidae, que representa los caracoles comestibles más grandes de América, (pudiendo llegar hasta los 163 mm de largo en *M. popelairianus*), y cuyas especies (conocidas como “*congompes*”) representan un valioso recurso de interés económico, social y comercial para el país, el cual se ha venido aprovechando durante generaciones por las comunidades nativas de la Amazonía, haciéndolo parte importante de la gastronomía regional. Asimismo, se le atribuyen distintas propiedades medicinales y estéticas (regeneradoras) sobre la piel, además de hacer uso artesanal de sus conchas (Ramírez y Cáceres, 1991; Ramírez *et al.*, 2003).

El hecho de contar con recursos como éstos abre un abanico de oportunidades para las zonas altoandinas y selváticas del país a mejorar su calidad de vida. Sin embargo, este aspecto positivo de la biodiversidad, ventajoso para el hombre, se ve opacado por el uso no sostenible de este recurso. La obtención de estos caracoles para su comercialización (en mayor parte) ocurre por extracción directa desde su ambiente natural, comprometiendo la biodiversidad del país e inclusive podría comprometer la integridad de los ecosistemas en los que habitan. Un ejemplo de esto ocurre en Bangladesh, donde la cosecha bruta de especies de caracoles con interés comercial causó un problema ambiental en el ecosistema de humedales (Baby *et al.*, 2010).

Las especies de *Megalobulimus* comercializadas en el interior del país son difícilmente distinguibles entre ellas, la gente que consume y comercializa este

recurso llama a todos los caracoles gigantes comestibles como “*congompe*”, sin saber que se trata de diferentes especies. Además, existe poco conocimiento sobre la situación poblacional de estos organismos. Es por ello por lo que se requiere estudiar en profundidad y proporcionar una correcta distinción entre especies, lo cual además provee de un sello de garantía para el desarrollo del biocomercio.

El biocomercio nace ante la necesidad de preservar la biodiversidad y desarrollar nuevas oportunidades económicas. El Perú no es ajeno a estas prácticas, como signatario del Convenio sobre la Diversidad Biológica en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el medio ambiente y el desarrollo (Rio de Janeiro, 1992), se comprometió a cuidar y preservar su biodiversidad, a través de la afirmación de la Resolución Legislativa N°26181, emitida en 1993. Por lo cual es de suma importancia para el país conocer y atender la situación actual de estos recursos.

En este marco, se busca generar suficiente información para discriminar correctamente a las especies del género *Megalobulimus* en el Perú, evidenciar la variedad poblacional que posee cada una y encontrar patrones en la distribución geográfica de sus poblaciones.

El principal problema taxonómico alrededor del género *Megalobulimus* Miller, 1878 ha sido la clasificación imprecisa de las especies basada únicamente en caracteres morfológicos, principalmente de la concha (Leme, 1973) ya que estos caracteres son ampliamente variables entre estas especies, lo cual

podría deberse a un alto nivel de plasticidad fenotípica. Frente a este escenario, se origina la necesidad de orientar esfuerzos en generar nuevos conocimientos a través de la genética y datos moleculares (Ramírez *et al.*, 2012).

Sin embargo, la mayor dificultad encontrada en los análisis moleculares mediante los marcadores moleculares clásicos validados para filogenias (Patwardhan *et al.*, 2014), tanto mitocondriales como nucleares (COI, 16S rRNA, ITS), se da cuando éstos llegan a su límite de resolución, es decir, no permiten estimar nueva información de diagnóstico útil para evaluar la diversidad genética requerida a niveles menores (interespecífica e intraespecífica). Para abordar el problema y obtener suficiente evidencia para estimar la variación intra e interespecífica de *Megalobulimus* (Borda y Ramírez, 2013; Ramírez *et al.*, 2013), se requiere el uso de un marcador molecular diferente, que supere la limitación existente en cuanto a resolución.

En este estudio se propuso emplear los marcadores del tipo ISSR (polimorfismo de repetición entre secuencias simple), ya que puede proporcionar información de distancias genéticas a un nivel taxonómico menor del encontrado con marcadores de secuencia, debido a su alto polimorfismo proveniente de secuencias flanqueantes de microsatélites (Khierallah, 2015); esta técnica desarrollada mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-ISSR) proporciona un nuevo enfoque *fingerprinting* aplicable para las comparaciones taxonómicas y filogenéticas, y funciona además como una herramienta de mapeo en una amplia gama de organismos. De manera que al usarse en

especies de *Megalobulimus* con poca o nula diferenciación molecular, permita distinguir entre poblaciones, con el fin de obtener el panorama completo sobre el ámbito evolutivo de las especies andino-amazónicas.

Esta técnica ya se ha venido usando de manera eficiente para una variedad de propósitos como, por ejemplo, la caracterización genética de numerosos organismos, desde el gusano de seda *Bombyx mori* (Reddy *et al.*, 1999), hasta cepas de hongos (Cano *et al.*, 2005). También ha mostrado ser útil para evaluar la diversidad genética de especies endémicas y en peligro de extinción (Qiu *et al.*, 2004) de plantas (Lu *et al.*, 2006; Sedighi y Rahimmalek, 2015). Además, es útil para identificar loci de rasgos genéticos como una herramienta de mapeo en una amplia gama de organismos (Zietkiewicz *et al.*, 1994), tales como en flora (Ratnaparkhe *et al.*, 1998), arroz (Blair *et al.*, 1999) y coníferas (Arcade *et al.*, 2000). También proveen suficiente información para develar relaciones filogenéticas interespecíficas e intraespecíficas, algunos ejemplos de esto es la asignación correcta de especies de peces con problemas taxonómicos y su diferenciación poblacional (Casu *et al.*, 2009; Wolfe y Liston, 1998; Joshi *et al.*, 2000; Wolfe y Randle, 2001; Wu *et al.*, 2005).

Adicionalmente, esta técnica también ha sido implementada con éxito en el estudio de la diversidad genética y filogenias de muchas especies de moluscos, un ejemplo de esto es el estudio poblacional del caracol acuático *Lymnaea natalensis* en Egipto, en el que se obtuvieron 47 bandas de ISSR mediante 5 cebadores, de las cuales el 63.63% mostraron altos niveles de polimorfismo (El-Khayat *et al.*, 2015). Por otro lado, la implementación de esta técnica en los

caracoles acuáticos *Pomacea canaliculata*, provenientes de diferentes regiones de China, ha sido especialmente informativa ya que con tan solo cuatro cebadores ISSR se ha llegado a obtener 498 loci de las cuales el 87.35% resultaron bandas polimórficas (Dong *et al.*, 2011).

Finalmente, la técnica ISSR-PCR combina las dos cualidades requeridas para los análisis de rutina: bajo costo y procesamiento rápido con requisitos mínimos de equipo (Harris, 1999). Esto, añadido a su versatilidad de usos, nos invita a estandarizar los protocolos de ISSR en *Megalobulimus* en la búsqueda de nueva información que revele las relaciones poblacionales de las especies *M. capillaceus* y *M. popelairianus*, así como las relaciones entre las especies de *Megalobulimus* estudiadas.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Importancia de los caracoles *Megalobulimus* como recurso genético para el Perú

#### ***Potencial gastronómico***

La carne ha desempeñado un papel fundamental en la evolución humana y es un componente importante de una dieta saludable y bien equilibrada debido a su riqueza nutricional. Los estudios citados a continuación comprueban que la carne de los caracoles terrestres comestibles representa una excelente opción de alimentación, ya que contiene elementos necesarios para el crecimiento y desarrollo adecuado del ser humano. Es así como los caracoles terrestres juegan un papel vital en la economía y tradición en Asia, solo en la India sirven como alimento al 80.81% de las familias pertenecientes a más de 30 castas (Baby *et al.*, 2010). Realidad no ajena al Perú, ya que el poblador amazónico, también viene consumiéndolo desde muchas generaciones atrás (Ramírez y Cáceres, 1991).

Fagbuaro *et al.* (2006) evaluaron la composición bioquímica de la carne de cuatro especies de caracoles terrestres gigantes africanos, con el objetivo de establecer sus valores nutricionales sobre la base del peso húmedo. El análisis del músculo reveló que la composición de proteína cruda varió de 18.66%  $\pm$  0.57% en *Limicolaria spp.* y 20.56%  $\pm$  0.05% en *Archachatina marginata* (Pfeiffer, 1858), mientras que el contenido de carbohidratos y grasa fue muy bajo en ambos. Otro estudio que refuerza el potencial gastronómico de estos caracoles fue realizado por Baby *et al.* (2010) quienes presentaron un análisis nutricional de seis especies de moluscos comestibles comercialmente importantes para

Bangladesh, encontrando que la composición mineral de la carne responde a calcio, fósforo, hierro, sodio y potasio; mientras que la composición de proteína bruta varió entre 8.27% y 12.93% del peso húmedo y un bajo contenido de grasa, en todas las especies analizadas. Otro estudio en moluscos sobre la composición nutricional de su carne fue realizado por Idayachandiran *et al.*, (2014) en la almeja común, *Donax cuneatus*, los resultados confirmaron el alto contenido de proteína en el tejido (23.9%), seguido de carbohidratos (8.3%) y lípidos (1.2%). Con un total de 20 aminoácidos esenciales y no esenciales presentes a una tasa de 42.19 y 38.37% respectivamente. Así como niveles muy altos de vitamina A (105.6 mg/g) y D (38.2 mg/g), seguidos de vitamina K (0.68 mg/g) y B6 (0.15 mg/g). Entre los minerales encontrados, el calcio se reporta en concentraciones altas (138.2 mg).

Resulta interesante comparar este contenido proteico con las principales fuentes de proteína en la dieta humana. De acuerdo con los datos de la Tabla nutricional portuguesa (INSRJ, 2006) presentado en el trabajo de Pereira & Vicente, (2013) el contenido promedio de proteína encontrado en la carne roja es de 22%, sin embargo, éste puede ser tan alto como 34.5% en pechuga de pollo o tan bajo como 12.3% en carne de pato. Empero, estas fuentes de proteína también presentan altas cantidades de grasas en rangos muy variables, así, podemos llegar a encontrar valores de 14% en carne de ternero, 19% en carne de res adulta, mientras que en promedio la carne de cerdo el rango alcanza 28% de contenido de grasa, pero en un solo corte de chuleta cruda puede presentar 17.3g de proteína y 31.8g de grasas totales (10.9 g de grasas saturadas).

Todos estos resultados indican que la carne de los moluscos es un alimento valioso para la nutrición humana, debido al alto contenido de proteína, aminoácidos bien equilibrados y muy bajo nivel de grasas.

### ***Potencial medicinal***

Como ha sucedido con otros recursos actualmente reconocidos, las comunidades amazónicas vienen empleando a las diferentes especies de *Megalobulimus* (“*congompes*”) para el tratamiento contra problemas respiratorios (Ramírez y Cáceres, 1991), por lo que es posible que tengan aplicaciones futuras en la medicina. Cabe resaltar que aún no se ha reportado algún tipo de zoonosis entre las especies del género *Megalobulimus*, pero este tipo de problemas es conocido en otros taxa de caracoles de tierra, como los africanos (*Achatina*) donde se reportó la presencia de parásitos que afectan al hombre (Almeida, 2016).

Es importante también resaltar el creciente interés nacional e internacional por las propiedades regeneradoras y rejuvenecedoras de “la baba” de caracol sobre la piel. Su secreción contiene mucopolisacáridos que sirven de materia prima para la elaboración de productos farmacéuticos (Etim *et al.*, 2016; Adikwu y Nnamani, 2005) por lo que éste sería otro posible uso para estos animales.

### ***Importancia ornamental***

Los *Megalobulimus* y otros moluscos, también suelen ser muy solicitados para fines de colección y creación de artesanía (MINCETUR, 2008). Actualmente muchos artesanos en la Amazonia suelen emplear las conchas de

*Megalobulimus* como materia prima para fabricar sus productos. Todas estas características de los moluscos le atribuyen una importancia socioeconómica, ya que existe un gran valor comercial en la captura de moluscos a partir de diferentes hábitats tanto en el Perú como en el mundo.

### ***Importancia ecológica y modelo de estudio evolutivo***

Los moluscos ocupan eslabones bajos en la cadena trófica y, por tanto, son soportes del resto de los animales, considerándose especies claves, especialmente en ecosistemas terrestres donde tienen un impacto significativo en la regulación de la densidad de las plantas y descomposición de la hojarasca (Mason, 1970). Asimismo, presentan importancia agrícola como depredadores y presas, ya que tienen efectos en la regulación de animales, especialmente otros moluscos, es sabido que algunas especies de caracoles de tierra constituyen plagas de cultivo, y a su vez, proporcionan el alimento para una gran cantidad de organismos, incluyendo muchos vertebrados. Una vez que mueren aportan sales minerales a la tierra debido al alto contenido de calcio y fósforo en sus conchas (Laskowski y Hopkin, 1996).

Los caracoles terrestres son un modelo ideal para entender el rol de la historia y la selección en el origen de la diversidad biológica (Davison, 2002), representando así el primer peldaño en los estudios de ecología molecular. Asimismo, son estudiados como importantes indicadores biogeográficos de eventos tectónicos tempranos (Solem, 1984). Debido a ello representan un excelente modelo para el estudio de los patrones filogeográficos existentes en el Perú debido a su bajo flujo génico y dada su prevalencia en distintos tipos de

hábitats, lo convierten en candidatos ideales para conocer la historia evolutiva de las diferentes regiones en las que habitan. Así, los caracoles *Megalobulimus* han sido objeto de estudio en muchos trabajos de índole filogeográficos.

## **2.2. El Perú como fuente de endemismo de moluscos de tierra, y la distribución de *Megalobulimus*.**

El Perú, cuyo territorio comprende los Andes tropicales y la Amazonia, es cuna de importantes endemismos en flora y fauna: plantas (5 330), aves (118), peces continentales (70), mamíferos (60), anfibios (181) y reptiles (113) (INEI, 2013). Sin embargo, un *phylum* importante para el Perú, es el de los moluscos, ya que lo sitúan como el país que alberga más especies endémicas en el mundo, albergando el 38% de la malacofauna estimada para Sudamérica, seguido de lejos por los otros países de la región, según una extensa recopilación realizada por Ramírez *et al.* (2003). En el mismo trabajo se reconocen 1 910 especies de moluscos y, de éstas, se han enumerado 763 especies de moluscos terrestres pertenecientes a 28 familias. Como ejemplo de nuestra diversidad en cuanto a endemismos de caracoles tenemos a los géneros *Neopetraeus*, *Newboldius*, *Llaucanianus* y *Sphaeroconcha* de la familia Bulimulidae distribuidos sobre la zona andina (Breure, 1979); *Zilchistrophia* de la familia Systrophiidae (Ramírez 1993), los 12 géneros (de 16 descritos para Sudamérica) de la familia Clausiliidae (Ramírez *et al.*, 2003), las 11 especies de las 17 descritas del género *Systrophia* de la familia Scolodontidae y, por supuesto, 9 especies endémicas de *Megalobulimus* (*M. capillaceus*, *M. florezi*, *M. carrikeri*, *M. lichtensteini*, *M. separabilis*, *M. huascari*, *M. indigens*, *M. tacayajus*, *M. imambarisense*) (Ramírez *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2012; Borda y Ramírez, 2013, 2016).

Esta distribución además es reconocida por regiones biogeográficas y ubicadas en una escala de altitud. Así, las especies del género *Megalobulimus*, en el Perú se ubican en su mayoría sobre la vertiente oriental de los Andes (3500 m s.n.m. – > 500 m s.n.m.) y la Amazonia (500 m s.n.m. – 100 m s.n.m) (Ramírez *et al.*, 2012; Borda y Ramírez, 2016).

Estudiando la biodiversidad y endemismo de estos caracoles, Ramírez *et al.*, (2012) identificaron que uno de los mayores centros de endemismos del Perú se ubica sobre la región Junín, específicamente en Chanchamayo e Inambari, las cuales son el centro de diversificación de muchas otras especies. Así como también se han reportado otras regiones con muy alta diversidad, como: Huánuco, Cajamarca, Amazonas y Cuzco, que representan puntos de concentración para las especies de este género (Ramírez *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2012).

En el caso de ***M. capillaceus*** (Pfeiffer, 1855), anteriormente se creía que tenía una distribución compartida entre Perú y Bolivia, pero las últimas investigaciones confirman que el material atribuido a *M. capillaceus* que fue reportado en Bolivia (museos FLMNH y FMNH) sería en realidad *M. intertextus* y no *M. capillaceus* como se creía, ultimando que *M. capillaceus* solo se distribuye en Perú y está restringida a las regiones de San Martín y Huánuco alcanzando el borde de la región Loreto (Borda y Ramírez, 2013). En la provincia de San Martín se puede citar a tres regiones eco-geográficas, donde se ha reportado esta especie: bosque húmedo premontano transicional a bosque húmedo tropical (Saposoá,

Piscayacu y Pasarraya), bosque húmedo premontano (Lamas, Moyobamba y Rioja) y bosque seco tropical (Tarapoto, Juan Guerra y Caspizapa) (García-Villacorta, 2009).

La especie ***M. florezi*** Borda y Ramírez, 2013 presenta ubicación muy restringida al norte de Cusco (Perú), hasta ahora ha sido reportada solo en la selva húmeda de La Convención y Calca (Borda y Ramírez, 2013). Comparte hábitat con ***M. leucostoma*** (Sowerby, 1835), la cual ha sido reportada en Cuzco al igual que ***M. florezi***, ambas especies en la provincia de La Convención (Borda, 2014). Esta provincia corresponde a la zona de vida Bosque Húmedo tropical (bh-t) según el sistema de Holdridge (Holdridge, 1947).

***M. carrikeri*** (Pilsbry, 1930) hasta el momento solo ha sido reportado en Chanchamayo, en la región de Junín, mientras que ***M. lichtensteini*** (Fulton, 1905), se conoce únicamente en Cajamarca y Amazonas, lo interesante es que actualmente se sabe que ambas especies son grupos hermanos y además, ambas son endémicas del Perú (Ramírez *et al.*, 2013).

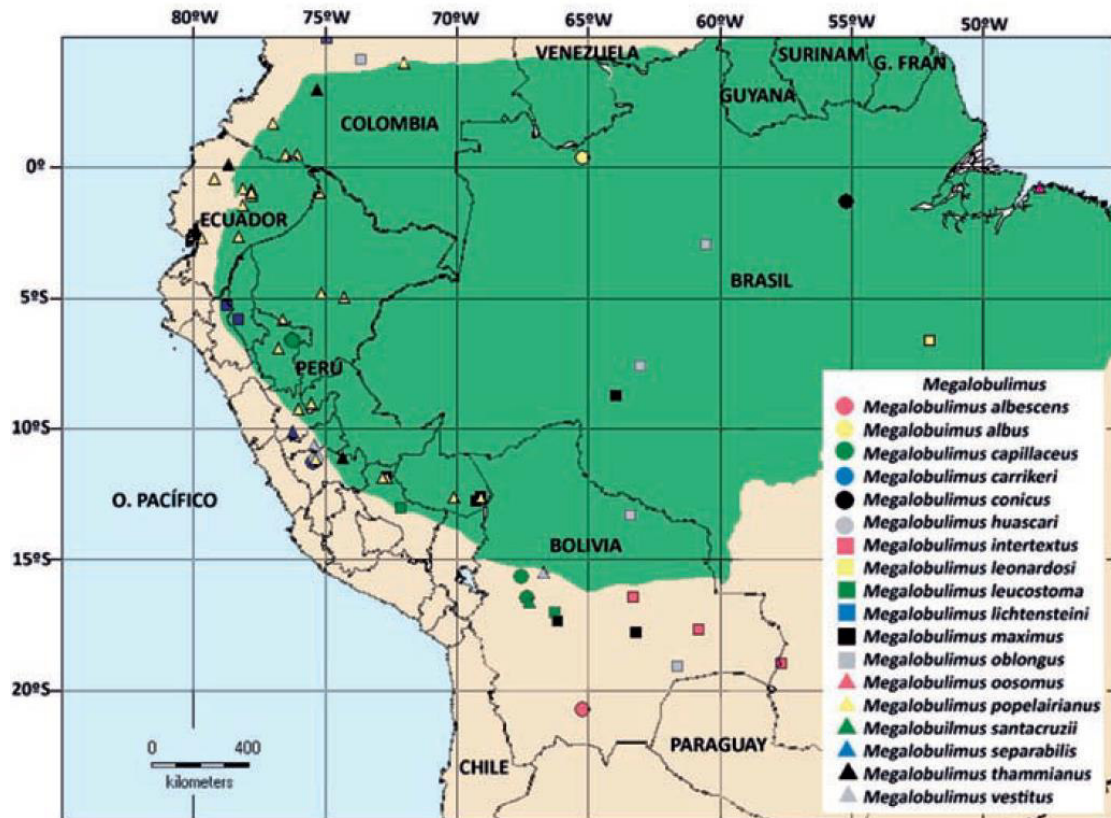
***M. separabilis*** (Fulton, 1903) ha sido reportada únicamente para el departamento de Huánuco, a una altitud de 2000 m.s.n.m. – 2010 m.s.n.m. (Ramírez *et al.*, 2012). Resulta ser especie hermana de ***M. huascari*** (Tschudi, 1852), la cual se encuentra en la región Junín, en Chanchamayo entre los 774 m.s.n.m. hasta los 1,754 m.s.n.m. y en la región Pasco, en Oxapampa entre 1496 m.s.n.m. y 1861 m.s.n.m. (Chirinos, 2012).

***M. tacayajus*** Borda y Ramírez, 2016 fue reportada por primera vez en el 2016 en la región de Huancavelica, en el valle del Mantaro, perteneciente a la provincia de Tayacaja. Se encuentra en localidades junto al río Mantaro desde Pichiu hasta Jatuspata, con una altitud de 2940 m.s.n.m. El hábitat es dominado por un arbusto caducifolio.

***M. imambarisense*** Borda y Ramírez, 2016, solo se encuentra en el sudeste del Perú, en el norte de Puno, específicamente en la localidad de Chacaneque en la provincia de Carabaya. Chacaneque se encuentra cerca del río Inambari. Su hábitat natural es un bosque tropical húmedo.

***M. popelairianus*** Nyst, 1845, que se caracteriza por ser el caracol terrestre comestible más grande de América, posee la concha de mayor tamaño (163 mm de longitud), contrario a las otras especies hermanas, es el grupo que posee la mayor distribución en la región Amazónica (Ramírez *et al.*, 2012), como se observa también con '***M. thammianus***', ambas presentan una distribución mayor a Perú, que incluye a Ecuador y Colombia. En Perú, ***M. popelairianus*** es encontrada en bosques de la vertiente oriental de los Andes y selva baja (112-690 m.s.n.m.); en Ecuador se encuentra tanto en bosques del Occidente (200-655 m.s.n.m.) como del Oriente (879-1220 m.s.n.m.) (Gram *et al.*, 2009), en Colombia ha sido registrada en las regiones de Amazonia (250-605 m.s.n.m.), Orinoquia (350 m.s.n.m.) y Andina (1000-1750 m.s.n.m.) (Ramírez *et al.*, 2012).





**Figura 1.** Distribución geográfica de especies del género *Megalobulimus* (Strophocheilidae) con distribución en la Amazonia. Tomado de Ramírez *et al.* (2012).

### 2.3. Problemática del género *Megalobulimus*

Se ha podido identificar importantes problemáticas que aquejan a las especies de este género. La primera se refiere a la pobre discriminación entre especies, basada inicialmente solo en caracteres morfológicos, la cual, en muchas ocasiones, no fue sustentada por los estudios moleculares posteriores. Otro problema biológico surgió cuando se hicieron estudios a nivel intraespecífico mediante marcadores moleculares de tipo secuencia (COI, 16S rRNA) ya que se observó que estos presentaron muy poca o ninguna variabilidad en algunas especies (Ramírez *et al.* 2012). A esto se suma la perjudicial sustracción no

regulada de las especies desde su hábitat para satisfacer la creciente demanda de este recurso.

Se ha encontrado que la mayoría de los caracteres anatómicos empleados en su sistemática (Leme, 1973) son homogéneos, lo que dificulta la diferenciación entre especies. Asimismo, se ha observado que, en muchos grupos de caracoles, las variaciones menores en la concha suelen ser resultado de la plasticidad fenotípica, como es el caso de la familia *Ampullariidae* introducida en Hawai (Chuong *et al.*, 2008) o tratarse de especies con amplia variedad morfológica como es el caso de *M. capillaceus* (Bequaert, 1948), cuyas conchas muestran una gran variedad de formas resultando en una identificación morfológica problemática a nivel de especie.

A pesar de existir un consenso claro para distinguir especies de gasterópodos, el cual incluye una combinación de mediciones morfométricas y análisis de la concha (Leme, 1973; Liew y Schilthuizen, 2016), el género *Megalobulimus* ha sido difícil de diagnosticar, concurriendo en diferentes confusiones entre estadios (juveniles y adultos) de una misma especie, así como también entre especies, son los casos de *M. capillaceus* (Pfeiffer, 1885) confundido con ejemplares juveniles de *M. musculus* (Bequaert, 1948) solo por la presencia de un labio rojo o confundido también con *M. separabilis* (Fulton, 1903) (Borda y Ramírez, 2013). Esto indica que los caracteres morfológicos, tradicionalmente utilizados para su ubicación taxonómica, no resultan confiables y necesitan ser respaldados por estudios moleculares.

Un claro caso (analizado en este trabajo) es la situación de la especie *M. popelairianus* Nyst, 1845, para la cual Martens (1876) describió tres variedades (*thammianus*, *dohrnianus* y *connectens*), y Bequaert (1948) la ubicó cercanamente relacionada a *M. maximus*. Sin embargo, estudios posteriores como el análisis filogenético de Ramírez *et al.* (2012) posicionaron a *M. popelairianus* como una especie distinta de *M. maximus*, así como también la ubicó en un clado independiente (pero de bajo soporte) de una de sus variedades descrita como *Megalobulimus popelairianus* var. *thammianus* por Martens (1876), proponiendo a '*M. thammianus*' como una especie independiente de *M. popelairianus*. Aunque, *M. popelairianus* y '*M. thammianus*' presentaron una variación interespecífica muy baja, cercana a la variación intraespecífica encontrada en otras especies del mismo género, lo que dejó en duda su estatus como especie distinta.

Tabla 1. Algunas diferencias morfológicas entre *M. popelairianus* y '*M. thammianus*' encontradas a partir de la descripción de Martens (1876) (recopilado por Tryon, 1895) y de Borda *et al.* (2010).

<b>Conchilla (Tryon; 1895)</b>		
	<b><i>M. popelairianus</i></b>	<b>'<i>M. thammianus</i>'</b>
<b>Color del último giro</b>	Pardo rojizo oscuro	Pardo amarillento oscuro
<b>Mallado en último giro</b>	No	Si (numeroso)
<b>Apertura (longitud)</b>	Ligeramente mayor a la mitad de la longitud de la conchilla	Igual tamaño que la mitad de la longitud de la conchilla
<b>Tubérculo calloso en la pared parietal</b>	No	Si
<b>Sutura</b>	-	Presencia de banda amarilla en la sutura
<b>Labio</b>	-	Labio de bordes amarillo
<b>Cutícula</b>	-	Pérdida de cutícula en manchas o en rayas

Glándula pediosa (Borda et al. 2010)		
	<i>M. popelairianus</i>	<i>'M. thammianus'</i>
<b>Morfología</b>	Forma de daga, alargada, deprimida y con bordes irregulares	Alargada, deprimida y con bordes lisos
<b>Ancho mayor</b>	Tercio anterior	Ancho es constante en casi todo su largo
<b>Piso de la glándula</b>	Levantamiento de longitud variable (5 – 14 mm)	No presenta levantamiento longitudinal

Otro ejemplo es cuando Bequaert (1948) consideró a *M. huascari* (Tschudi, 1852) como una subespecie de *M. maximus* (Sowerby, 1825), lo cual fue contradicho por los resultados de Ramírez *et al.* (2012), donde las secuencias 16S rRNA de *M. huascari* formaron un clado filogenéticamente lejano de *M. maximus*.

Además, los estudios filogenético-moleculares más recientes arrojaron nula diversidad genética entre las especies *Megalobulimus capillaceus* y *M. florezi*; y poca divergencia entre *M. popelairianus* y *'M. thammianus'* (Ramírez *et al.*, 2012; Ramírez *et al.* 2013; Borda y Ramírez, 2013). Esto significaría que, ante condiciones adversas para la especie, éstas tendrían pocas oportunidades de sobrevivir.

## 2.4. Estudios moleculares y filogenia de las especies del género *Megalobulimus*

Existen muchas ventajas en la implementación de marcadores moleculares para develar la historia evolutiva de diferentes taxa, así como para su caracterización. Por un lado, los parámetros morfológicos a menudo son limitados en número y obtenerlos para caracterizaciones de rutina se vuelve complicado, sobre todo

cuando se quiere obtener una clasificación detallada a nivel de especie o sub-especie.

En *Megalobulimus* es usual que la descripción de una especie se base en los caracteres morfológicos de la conchilla, sin embargo, se ha ido complementando la información de las partes blandas (glándula pedal, complejo paleal, sistema digestivo y reproductor) como en la última reevaluación de *Megalobulimus* de labio rojo del Perú (Borda, 2011; Borda y Ramírez, 2013). Aunque de todas maneras las adaptaciones morfológicas de un organismo son reflejo de sus biomoléculas y viceversa, existen muchos más caracteres moleculares disponibles y cuya interpretación es generalmente más sencilla de realizar, cada nucleótido podría considerarse como un carácter y ser asumido como independiente.

Los estudios moleculares sobre la filogenia mundial de los gasterópodos pulmonados *Stylommatophora* corroboran la posición del género *Megalobulimus* en el clado *no-achatinoideo*, esto basado en el análisis de ADN usando los marcadores moleculares 16S rRNA y 5.8S-ITS2-28S rRNA, pero sus relaciones con otros géneros aún permanecen inciertas (Wade *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2012). En la actualidad, la investigación más completa corresponde a la tesis de carácter filogenético realizada por Borda (2014) quien empleó los marcadores moleculares COI y 16R rRNA, así como caracteres morfológicos para mostrar las relaciones evolutivas dentro del género *Megalobulimus*.

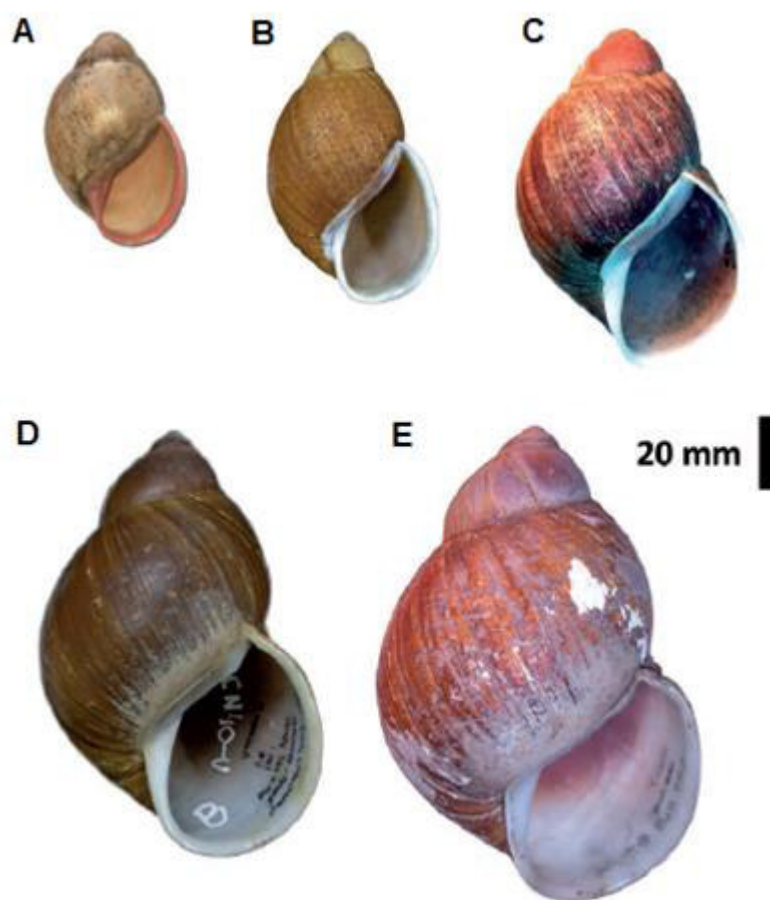
Muchas especies de *Megalobulimus* ostentan la singular característica de poseer una amplia variedad morfológica, pero en los análisis moleculares exhiben escasa o nula distancia genética. En este estudio nos hemos enfocado en seis especies por encontrarse nula diferenciación (*M. capillaceus* y *M. florezi*) y escasa divergencia (*M. popelairianus*, y '*M. thammianus*') evidenciado con marcadores moleculares de secuencia (Ramírez et al., 2012; Borda, 2014).

Hasta el momento se han realizado estudios filogenéticos a nivel del género *Megalobulimus* en las siguientes especies: *M. florezi* (Borda et al., 2013), *M. capillaceus*, *M. separabilis* (Borda y Ramírez, 2013; Ramírez et al., 2012), *M. huascari*, *M. lichtensteini*, *M. maximus*, *M. popelairianus* y '*M. thammianus*' (Ramírez et al., 2012). Según los resultados moleculares con 16S rRNA, las tres especies endémicas de Perú (*M. huascari*, *M. separabilis* y *M. lichtensteini*) formaron un grupo monofilético, donde las especies *M. huascari* y *M. separabilis* son hermanas y *M. lichtensteini* se presenta como basal a las anteriores. A partir de las topologías de árboles (MP, ML e IB) se observa un clado grande muy bien sustentado formado por *M. huascari* y *M. separabilis*, con *M. lichtensteini* basal a los dos anteriores, y *M. popelairianus* formando un clado interno con '*M. thammianus*', y quedando basal a todo este grupo monofilético *M. maximus*, y basal a todos los anteriores *M. capillaceus* (Ramírez et al., 2012).

Actualmente se están sumando esfuerzos por complementar la limitada información morfológica con datos moleculares obtenidos por ADN, ya que este género ha presentado varios inconvenientes con su identificación, y en los

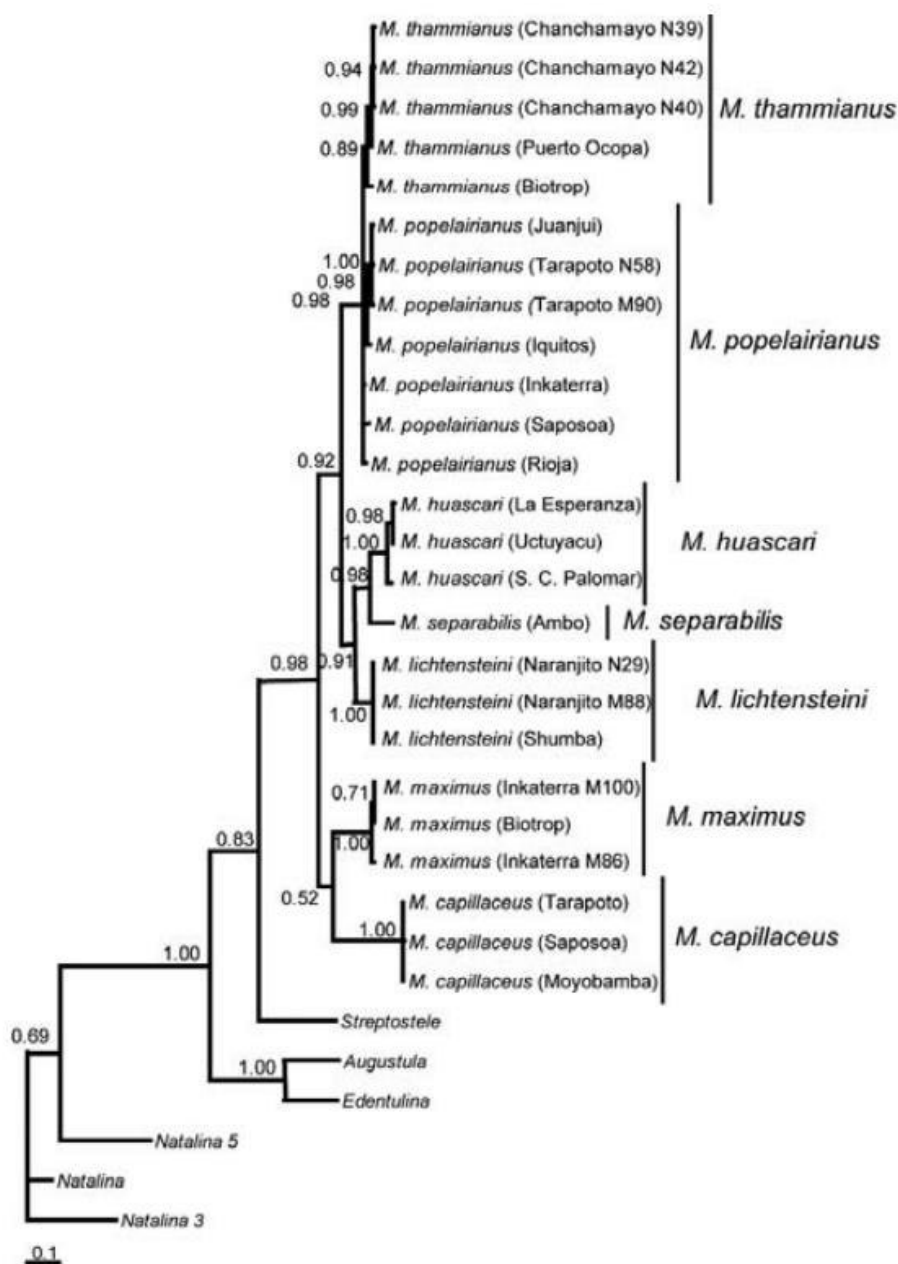
últimos años se han descrito tres especies nuevas de *Megalobulimus* al sur del Perú, *M. florezi* (Borda y Ramírez, 2013), *M. tayacajus* y *M. inambarisense* (Borda y Ramírez, 2016), basadas en caracteres morfológicos, ampliamente respaldados por filogenias moleculares para *M. tayacajus* y *M. inambarisense*, pero no para *M. florezi* (com. pers. R. Ramírez).

Algunos casos que necesitan análisis más profundos son los que surgen en *M. capillaceus*, ésta muestra una impresionante variabilidad intraespecífica en la morfología de su concha, además de presentar una amplia distribución, causando gran confusión taxonómica. Paradójicamente, los resultados obtenidos mediante evidencia molecular no aportan suficiente información para evidenciar las diferencias mencionadas, encontrando una exigua diversidad genética (Congrains *et al.*, 2009). En este marco también tenemos el caso de *M. florezi*, quien era considerada como una variedad de *M. capillaceus*, y que luego fue descrita como especie nueva en el año 2013 por Borda y Ramírez (2013), a partir de individuos atribuidos inicialmente como *M. capillaceus*, ubicados únicamente al norte del Cuzco (Perú).



**Figura 2.** Conchas de *Megalobulimus* procedentes de Perú. (A) *M. capillaceus* (Reg. San Martín). (B) *M. carrikeri* (Reg. Junín). (C) *M. lichtensteini* (Reg. Amazonas). (D) *M. thammianus* (Reg. Junín). (E) *M. popelairianus* (Reg. Madre de Dios). Editado de Ramírez *et al.* 2012.





**Figura 3.** Árbol bayesiano de siete especies de *Megalobulimus* de la Amazonia occidental, basado en un segmento del gen mitocondrial 16S rRNA. Tomado de Ramírez *et al.* (2012).

En la figura 3 se observa un árbol filogenético construido mediante inferencia bayesiana por Ramírez *et al.*, (2012) donde *M. popelairianus* y '*M. thammianus*'

forman dos grupos bien definidos, pero con poca distancia entre ellos, lo que amerita un análisis más profundo usando otros marcadores más polimórficos, como los propuestos en el presente estudio.

## **2.5. ISSR como marcador de alta resolución para el estudio de especies y poblaciones**

Los ISSR (por sus siglas en inglés *Inter-Simple Sequence Repeats*) son fragmentos de ADN de aproximadamente 100-3000pb localizados entre regiones de microsatélites en el genoma. La generación de bandas de ISSRs se da por amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un único cebador que corresponde a las secuencias repetidas de microsatélites que pueden ser di-nucleótidos, tri-nucleótidos, tetra-nucleótidos o penta-nucleótidos (Aitken y Smith, 1997). Estos cebadores pueden estar anclados en uno de sus extremos 5' o 3' con 1 a 4 bases degeneradas extendidas sobre las secuencias flanqueantes (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 2002), es decir, éstas se hallan adyacentes al ISSR que se quiere amplificar. El producto resultante es una porción del genoma ubicado entre dos cebadores de microsatélites idénticos con una orientación opuesta en la cadena de ADN.

Una ventaja de usar estos marcadores es que las secuencias de microsatélites empleadas como cebadores se distribuyen ampliamente en todo el genoma. Por lo tanto, esta técnica permite detectar rápidamente una gran parte del genoma, sin que se requiera el conocimiento *a priori* de la secuencia que se procura amplificar, a diferencia de los marcadores moleculares de secuencia.

Su alta variabilidad genética está basada en que la cadena molde de ADN del que está constituido, presenta mutaciones en el sitio de *priming*, esta variabilidad de los ISSR puede verse aumentada debido a la naturaleza misma del *primer* usado (anclado al extremo 5' o al extremo 3') y a la secuencia de nucleótidos repetida en el *primer* (Ng y Tan, 2015). Dadas todas estas condiciones, suele obtenerse un alto polimorfismo, por lo que los marcadores ISSR suelen ser empleados para dilucidar las relaciones entre grupos cercanos, como poblaciones dentro de una especie, obteniendo una alta variabilidad intraespecífica, a diferencia de otros marcadores empleados convencionalmente para resolver filogenias que pueden llegar al límite de resolución.

No obstante, esta técnica de PCR-ISSR puede presentar ciertas limitaciones, debido a que la PCR-ISSR es una técnica *multilocus*, la condición di-alélica del marcador (presencia/ausencia) puede causar algún problema de interpretación, como la ausencia de una banda podría corresponder a una o varias divergencias en el sitio del cebador o a una reordenación cromosómica (Wolfe y Liston, 1998) y la presencia de dos bandas con el mismo tamaño no afirma necesariamente la similitud, ya que es posible que estos fragmentos no sean homólogos, haciendo que la variabilidad probablemente esté subestimada. A esto se puede agregar algún problema de reproducibilidad en la técnica (Aitken y Smith, 1997).

Un ejemplo de la eficiencia única de ISSR se evidenció al analizar la estructura genética de la plaga más destructiva de los cultivos de Brassicaceae en todo el mundo, *Plutella xylostella*, la cual causa la pérdida de más del 90% del cultivo

(Roux *et al.*, 2006) y presenta resistencia a los insecticidas DDT (diclorodifeniltricloroetano) y Bt (*Bacillus thuringiensis*) costando mil millones de dólares estadounidenses anuales en todo el mundo controlar su propagación (Talekar y Shelton, 1993). Roux *et al.* (2006), presentaron la combinación de la técnica PCR-ISSR como una poderosa herramienta para identificar y discriminar 19 poblaciones de *Plutella xylostella*, resultando que cada una de las 19 poblaciones provenientes de todo el mundo eran genéticamente distintas. El empleo de estos marcadores ISSR también permitió determinar el origen migratorio que permitió la propagación de esta plaga en China, así como también, estimar las potenciales rutas migratorias a las que seguiría esta plaga (Yang *et al.*, 2015).

Por su parte Joshi *et al.* (2000) realizaron un análisis del género *Oryza* empleando marcadores ISSR, el dendograma obtenido con el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) agrega nueva información a la discriminación del género *Oryza*, obtenida por otros marcadores moleculares y morfológicos, lo cual permitió mejorar el entendimiento de las relaciones evolutivas dentro del género *Oryza*.

Yi *et al.* (2017) hicieron uso de marcadores del tipo ISSR para analizar la diversidad genética de poblaciones de Geranio (*Pelargonium graveolens*) diploides y poliploides que no presentaban diferencia fenotípica evidente en los campos, obteniendo tasas de variación entre 13.3% y 6.7%, respectivamente mediante los tres cebadores ISSR usados. La tendencia de los ISSR fue consistente en mostrar que las diferencias genéticas individuales en las

poblaciones diploides son mayores que en las plántulas poliploides. Esto sirvió para determinar que las plántulas poliploides de una población son relativamente uniformes y mejor aplicables a la producción. Además, este es un ejemplo de cómo los marcadores ISSR pueden develar patrones genéticos (en este caso conocidos de antemano) en poblaciones con aparente poca o casi ninguna divergencia morfológica. Los ISSR tendrán un papel trascendental en asegurar la prioridad de las variedades vegetales en virtud de su eficiencia única para distinguir incluso los germoplasmas estrechamente relacionados.

Tabla 2. Algunas aplicaciones de los ISSR en el estudio de la biodiversidad. Tomado de Reddy *et al.* (2002)

S. No	Application	Reference
1	<b>Genomic fingerprinting</b>	
	Cocoa germplasm	Charters & Wilkinson, 2000
	Potato cultivars	Prevost & Wilkinson, 1999
	Chrysanthemum cultivars	Wolff <i>et al.</i> , 1995
2	<b>Genetic diversity and phylogenetic analysis</b>	
	Rice cultivars	Virk <i>et al.</i> , 2000
	<i>Oryza granulata</i>	Qian <i>et al.</i> , 2001
	Wheat ( <i>Triticum</i> sp.)	Nagaoka & Ogihara, 1997
	Barley ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Sanchez <i>et al.</i> , 1996
	Maize inbred lines ( <i>Zea mays</i> )	Kantety <i>et al.</i> , 1995
	Finger millet ( <i>Eleusine</i> sp.)	Salimath <i>et al.</i> , 1995
	Sorghum (Chinese) ( <i>Sorghum bicolor</i> )	Yang <i>et al.</i> , 1996
	White lupin germplasm ( <i>Lupinus albus</i> )	Gilbert <i>et al.</i> , 1999
	<i>Vigna</i> sp	Ajibade <i>et al.</i> , 2000
	Pea germplasm ( <i>Pisum sativum</i> )	Lu <i>et al.</i> , 1996
	Soybean ( <i>Glycine max</i> )	Wang <i>et al.</i> , 1998
	Oilseed rape cultivars ( <i>Brassica napus</i> )	Charters <i>et al.</i> , 1996
	Sweet potato, wild relatives ( <i>Ipomoea</i> sp)	Huang & Sun, 2000
	Potato cultivars ( <i>Solanum tuberosum</i> )	McGregor <i>et al.</i> , 2000
	Redcurrant germplasm ( <i>Ribes</i> sp)	Lanham & Brennan, 1998
	Grapevine germplasm ( <i>Vitis vinifera</i> )	Moreno <i>et al.</i> , 1998
	Citrus cultivars ( <i>Citrus</i> sp)	Fang & Roose, 1997
	Trifoliate orange germplasm ( <i>Poncirus trifoliata</i> )	Fang <i>et al.</i> , 1997
	<i>Plantago major</i> subspecies	Wolff & Morgan- Richards, 1998
	Gymnosperms, Douglas fir and sugi	Tsumura <i>et al.</i> , 1996
3	<b>Genome mapping</b>	
	Saturating RFLP linkage map in barley	Becker & Heun, 1995
	Construction of a genetic linkage map in Einkorn wheat	Kojima <i>et al.</i> , 1998
	Genetic mapping of Japanese and European types of larch	Arcade <i>et al.</i> , 2000
	Saturating genetic linkage map in citrus	Sankar & Moore, 2001
	Saturating RFLP/RAPD linkage map in soybean	Wang <i>et al.</i> , 1998
4	<b>Determining SSR motif frequency</b>	
	Recovery of microsatellite sequences in the mustard genome	Varghese <i>et al.</i> , 2000
	Distribution pattern of microsatellites across eukaryotic genomes	Gupta <i>et al.</i> , 1994
	Analysis of microsatellite frequency in rice cultivars	Blair <i>et al.</i> , 1999
5	<b>Gene tagging and use in marker assisted selection</b>	
	<i>Rf-1</i> gene for fertility restoration in rice	Akagi <i>et al.</i> , 1996
	Gene for resistance to <i>Fusarium</i> wilt Race 4 in chickpea	Ratnaparkhe <i>et al.</i> , 1998
	Temperature sensitive genic male sterility in rice	Hussain <i>et al.</i> , 2000
	<i>Fgr</i> gene for modulating fructose to glucose ratio in tomato	Levin <i>et al.</i> , 2000
	Genome/species specific markers in <i>Lolium</i> and <i>Festuca</i>	Pasakinskiene <i>et al.</i> , 2000
	Putative genome/species specific markers in <i>Oryza</i> .	Joshi <i>et al.</i> , 2000
	Race specific markers in fungi	Hantula <i>et al.</i> , 1996
6	<b>Evolutionary biology</b>	
	<i>Diplotaxis</i> species	Martin & Sanchez-Yelamo, 2000
	Diploid hybrid speciation in <i>Penstemon</i>	Wolfe <i>et al.</i> , 1998

La técnica de PCR-ISSR también ha sido implementada con éxito en el estudio de la diversidad genética y filogenias de muchas especies de moluscos. Un ejemplo de esto es en poblaciones del caracol acuático *Lymnaea natalensis* en Egipto, se ha podido generar 47 bandas de ISSR mediante cinco cebadores, de las cuales el 63.63% mostraron altos niveles de polimorfismo (El-Khayat *et al.*, 2015). Por otro lado, la implementación de esta técnica en los caracoles acuáticos *Pomacea canaliculata*, provenientes de diferentes regiones de China, ha sido especialmente informativa ya que con tan solo cuatro cebadores ISSR (incluyendo UBC811 utilizado en este trabajo) se ha llegado a obtener 498 loci de las cuales el 87.35% resultaron bandas polimórficas (Dong *et al.*, 2011). Otros ejemplos se encuentran mencionados en la Tabla 3.

Tabla 3. Estudios en moluscos que implementan la técnica ISSR. La mayoría de estos estudios han tenido como objetivo la evaluación de la diversidad genética y relaciones filogenéticas.

Especie	Tipo de molusco		Referencia
<b><i>Chondrula tridens</i></b>	Molusco terrestre	pulmonado	Snegin, 2014
<b><i>Lymnaea natalensis</i></b>	Molusco acuático	pulmonado	El-Khayat <i>et al.</i> , 2015
<b><i>Pomacea canaliculata</i></b>	Molusco dulceacuícola		Dong <i>et al.</i> 2011
<b><i>Helix pomatia L.</i></b>	Molusco terrestre	pulmonado	Snegin, 2017
<b><i>Patella ulyssiponensis</i></b>	Molusco marino		Cossu <i>et al.</i> , 2015

### 3. HIPÓTESIS

Los marcadores del tipo ISSR revelarán diferenciación genética interespecífica y a nivel de poblaciones en especies del género *Megalobulimus* que no fueron resueltas con marcadores de secuencia.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

- Evaluar la diversidad genética y estructura poblacional de especies de caracoles comestibles (*Megalobulimus*) endémicos de la Amazonia mediante el análisis con marcadores ISSR.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar y optimizar un protocolo de PCR para análisis de marcadores ISSR en *Megalobulimus spp.*
- Obtener los perfiles de ISSR de *M. capillaceus* y *M. florezi*, especies de *Megalobulimus* que no presentaron divergencia genética interespecífica mediante marcadores de secuencia.
- Obtener los perfiles de ISSR de *M. popelairianus* y '*M. thammianus*' especies de *Megalobulimus* que mostraron poca divergencia genética interespecífica mediante marcadores de secuencia.
- Obtener perfiles de *M. carrikeri*, y *M. lichtensteini*, otras dos especies divergentes.
- Evaluar el grado de variación genética y diferenciación intra e interespecífica de seis especies de *Megalobulimus* usando cebadores ISSR.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de todos los protocolos fue llevado a cabo en el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### 5.1 Material biológico

El método de colecta empleado fue búsqueda cualitativa visual (Coppolino, 2010) directamente en los bosques y poblados aledaños a éstos, donde se reportó su hábitat. Para conocer la distribución geográfica exacta de las seis especies involucradas en el presente estudio se hizo una revisión de datos geográficos publicados con anterioridad (Bequaert, 1948; Ramírez *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2012), localidades de colecta detalladas en tabla 5.

Se trabajó inicialmente con 69 individuos pertenecientes a seis especies del género *Megalobulimus*, las muestras cuyo código inicia con las letras “T”, “W” y “X” (la codificación solo obedece al orden de extracción) fueron colectadas entre el 2017 e inicios del 2018 exclusivamente para este proyecto y de las cuales se obtuvo ADN fresco. El resto de las muestras fueron colectadas en años anteriores para otros proyectos de investigación del laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la UNMSM (proyectos CON-CON N° 151001021, 141001031, 121001071, 111001241, 101001091; PEM2007B28) y se utilizó el ADN previamente extraído de estas muestras.

También se utilizó material conservado de *M. florezi* que forma parte de las colecciones del Departamento de Malacología del MHN-UNMSM, en conjunto con el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la FCB-UNMSM, de las cuales se obtuvieron ADN antiguo; esto se realizó de esta manera ya que

no se pudo obtener más ejemplares en las colectas realizadas y ya no se contaba con ADN preservado. La identificación taxonómica de todos los ejemplares fue realizada por la Dra. Rina Ramírez tomando en cuenta los diversos caracteres morfológicos de la conchilla y otros.

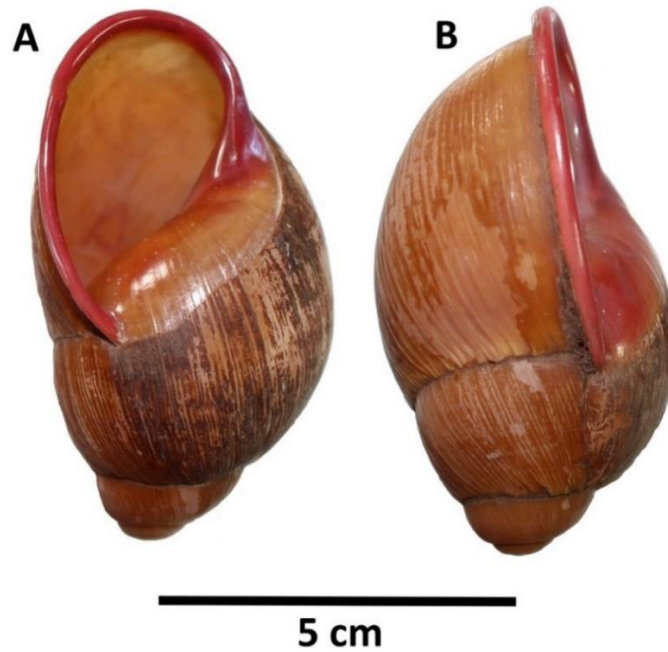
En el transcurso de este estudio se acondicionó un criadero de *Megalobulimus* para poder observar a los animales con detenimiento y a la vez para obtener material fresco para las extracciones siempre que se pudiera, asegurando así la integridad del ADN genómico. Todos los individuos fueron fotografiados y medidos, las imágenes digitales se capturaron con una cámara Canon it5 rebel. Todas las fotografías mostradas a continuación fueron tomadas para este estudio en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la FCB-UNMSM.

Una vez obtenida la cantidad de tejido necesaria para el estudio (1cm<sup>3</sup>), cada individuo-*voucher* fue preservado en alcohol 96° y ahora forman parte de las colecciones científicas del Departamento de Malacología del MHN-UNMSM, a cargo de la Dra. Rina Ramírez.

### ***Megalobulimus capillaceus***

Los ejemplares de ***M. capillaceus*** (Figuras 4, 5 y 6) provienen del distrito de Juan Guerra (Provincia de San Martín), Centro poblado de Huingoyacu (Provincia de Bellavista), y de la ciudad de Tingo María (Provincia de Leoncio Prado - Huánuco) colectados entre los meses de octubre y diciembre del 2017. Sin embargo, la naturaleza de este estudio requería extender el número de muestras para poder analizar más poblaciones de la especie, por ello se trabajó también con especímenes almacenados en la colección científica de Malacología del MHN-UNMSM depositados en estudios anteriores, los cuales fueron colectados entre enero y febrero del 2008 en las localidades de Tarapoto (Provincia de San Martín), Juan Guerra (Provincia de San Martín), Caspizapa (Provincia de Picota), Lamas (Provincia de Lamas), Moyobamba (Provincia de Moyobamba), Saposoa (Provincia de Huallaga), Rioja (Provincia de Rioja) y Pisco yacu (Provincia de Huallaga) ubicadas en la región San Martín, como parte de la tesis de pregrado de Congrains (2010). Los especímenes correspondientes a la región de Huánuco fueron colectados en octubre del 2009 en los distritos de Tingo María y Aucayacu en la provincia de Leoncio Prado, como material en la tesis de pregrado de Borda (2011).

Las fotografías de los individuos *M. capillaceus* están mostradas en las figuras 4 - 6, las localidades donde provienen los individuos de *M. capillaceus* se resumen en la tabla 4.



**Figura 4.** Conchillas de *Megalobulimus capillaceus* provenientes de Huingoyacu, Prov. Bellavista, Departamento de San Martín. Códigos W30 (A) y W31 (B).



**Figura 5.** Individuo preservado de *Megalobulimus capillaceus* proveniente de Tingo María, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco. Código W56.



**Figura 6.** Individuos vivos de *Megalobulimus capillaceus* provenientes del distrito de Juan Guerra, Prov. San Martín, Departamento de San Martín. Códigos W35 (A) y W34 (B). Se empleó un papel milimetrado como referencia de tamaño.

**Tabla 3.** Zonas de muestreo, donde se colectaron poblaciones de *M. capillaceus*.

Región	Provincia	Distrito	Latitud	Longitud	Altitud
San Martín	San Martín	Juan Guerra	6°35'3.7"S	76°19'20.7"W	237 m
	Bellavista	Huingoyacu	9°17'01.9"S	76°01'0.2"W	657 m
	Bellavista	Huallaga	6°56'21.8"S	76°46'18.8"W	318m
	Rioja	Rioja	6°04'18.1"S	77 09' 48.5''	-
	Moyobamba	Moyobamba	6°02'11.2"S	76°58'26.2"W	887 m
Huánuco	Leoncio Prado	Tingo María	9°16'39.6"S	76°00'41.9"W	747 m





**Figura 7.** Localización en el mapa de los puntos de colecta de las diferentes poblaciones de *Megalobulimus capillaceus*.

### ***Megalobulimus florezi***

Los especímenes de ***M. florezi*** (Figura 8) usados en este estudio fueron tomados de la colección del Departamento de Malacología del MHN-UNMSM, depositados por estudios anteriores (Borda y Ramírez, 2013), procedentes de cinco localidades diferentes pertenecientes a la región de Cuzco, los cuales fueron colectados en los distritos de Quillabamba y Echarate (provincia de La Convención) durante enero y febrero del 2009; Pavayoc, Santa María y Sambaray (provincia de La Convención) durante febrero, marzo y junio del 2012. Ésta es la única especie que se trabajó con el 100% de individuos preservados en alcohol de 96°C, dado que no se pudo conseguir muestras frescas en el muestreo realizado en su localidad tipo (Pavayoc y Quillabamba – Cuzco, 2017 – 2018).



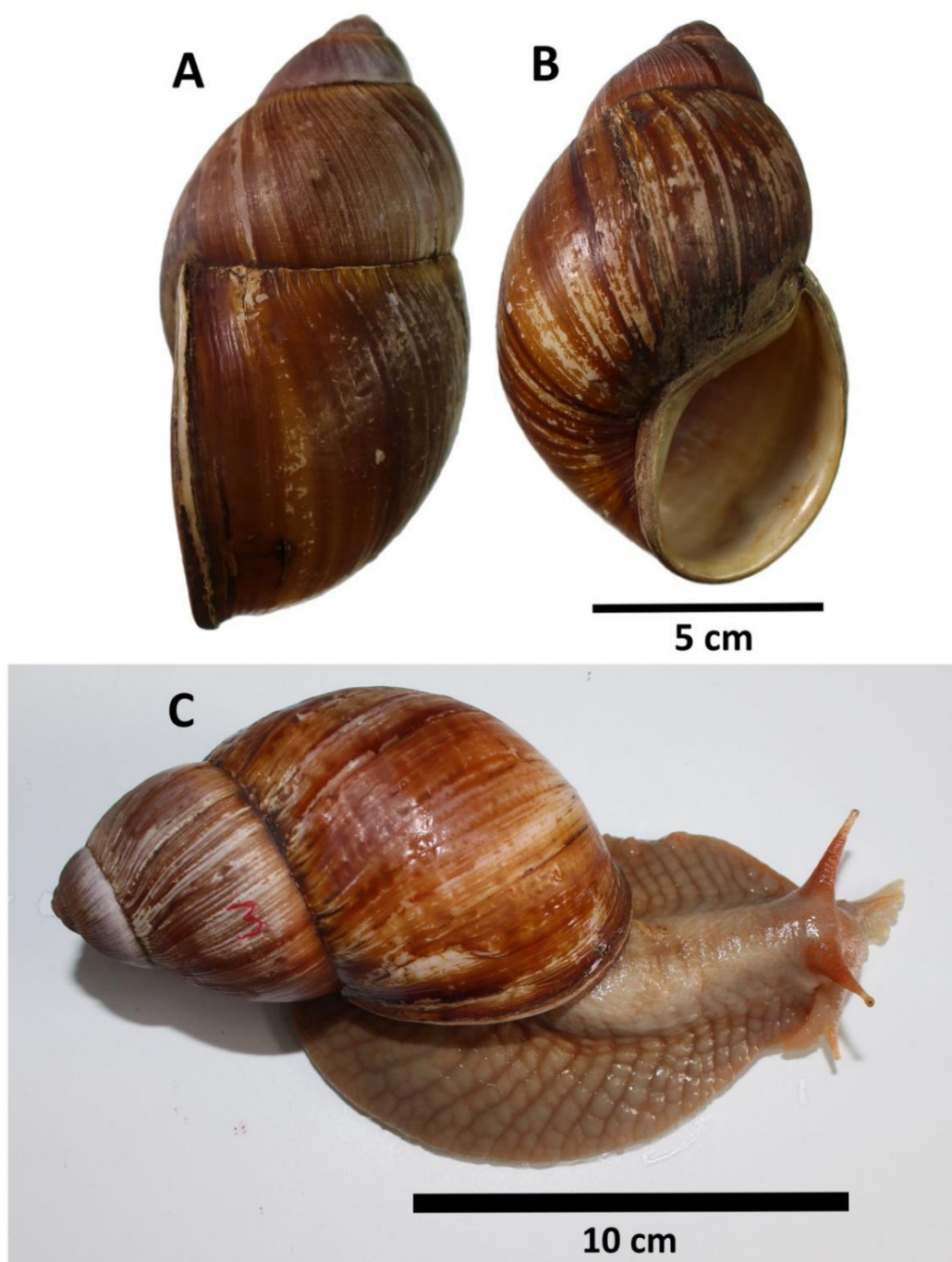
**Figura 8.** Individuo preservado de *Megalobulimus florezi* proveniente del distrito de Echarate, Prov. La convención, Departamento de Cuzco. Código X36. Foto en tres vistas diferentes.



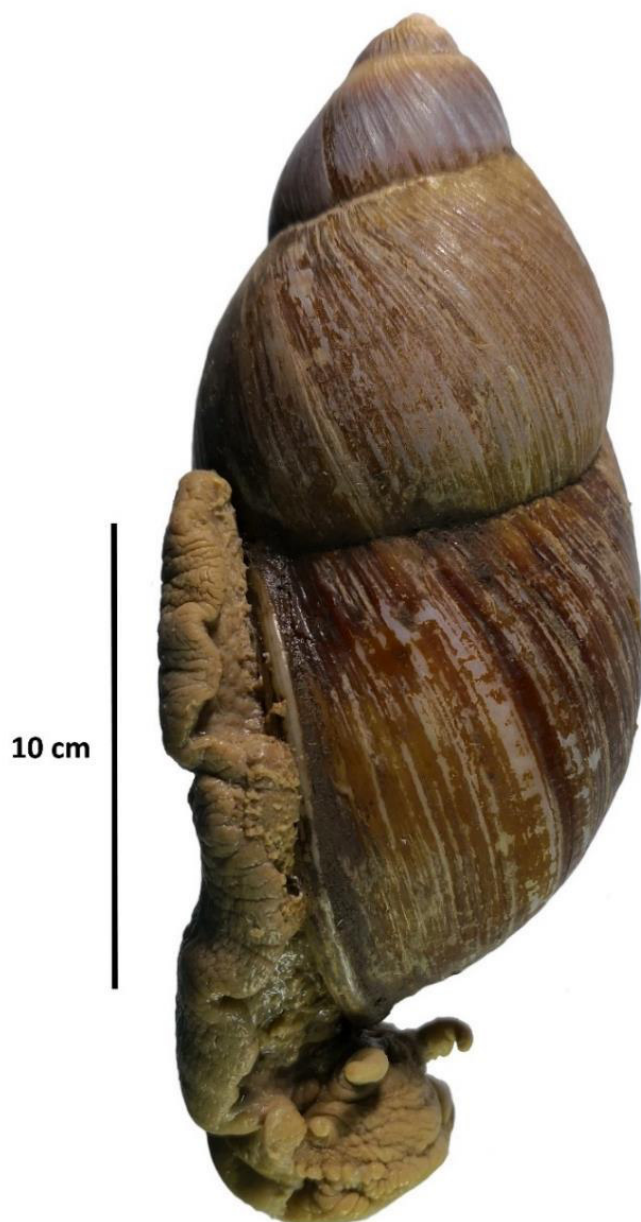
### ***Megalobulimus popelairianus sensu lato (incluye a M. thammianus)***

*M. popelairianus* y '*M. thammianus*', representan a los caracoles terrestres más grandes distribuidos sobre el Perú (Figuras 9-11), ambos presentan características de la concha muy similares que resultan fácilmente confundibles uno con el otro, y en vista de que no está claro el estatus taxonómico de *Megalobulimus thammianus* en este estudio se analizó en conjunto ambas denominaciones y se trabajó como si se tratara de un complejo de especies, por lo tanto, al señalar *M. popelairianus sensu lato* no discrimina entre los grupos, pudiendo ser cualquiera de ellos.

Las muestras que inicialmente fueron asignadas como ***M. popelairianus*** fueron colectadas en tres regiones del Perú: San Martín, Madre de Dios y Junín, en las localidades de Buenos Aires y San Cristóbal (Provincia de Picota), Huingoyacu (Provincia Bellavista) y las muestras provenientes de Tingo María (Huánuco) fueron consideradas como '***M. thammianus***'. Adicionalmente se consideró trabajar las muestras depositadas en la colección del Departamento de Malacología del Museo de Historia Natural de la UNMSM, que fueron colectadas desde febrero del 2008 en las localidades de Rioja, Saposoa (Pasarraya) y uno comprado en el mercado de Juanjuí (provincia de Huallaga, región San Martín).



**Figura 9.** Conchillas (A y B) e individuo vivo (C) de *Megalobulimus popelairianus sensu lato*, provenientes del distrito de Juan Guerra, Prov. San Martín, Departamento de San Martín. Códigos W28 (A y B) y W53 (C). Fotografía en tres vistas diferentes.

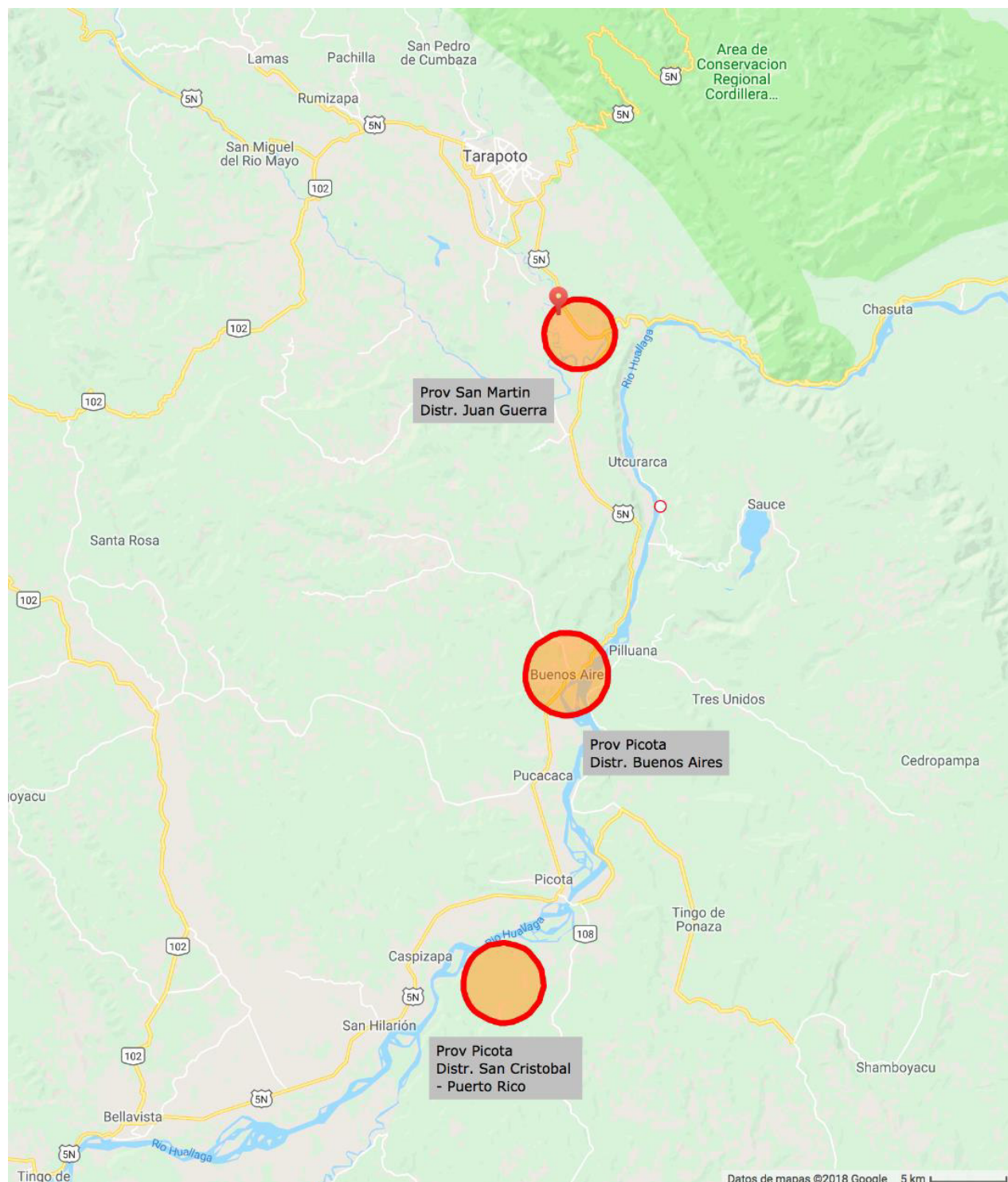


**Figura 10.** Individuo preservado de *Megalobulimus popelairianus* proveniente del distrito de Buenos Aires, Prov. Picota, Departamento de San Martín. Código T29.



**Figura 11.** Comparación de individuos vivos asignados como *Megalobulimus popelairianus* s.l. provenientes de los distritos de Juan Guerra y San Cristóbal, Prov. Picota, Departamento de San Martín.





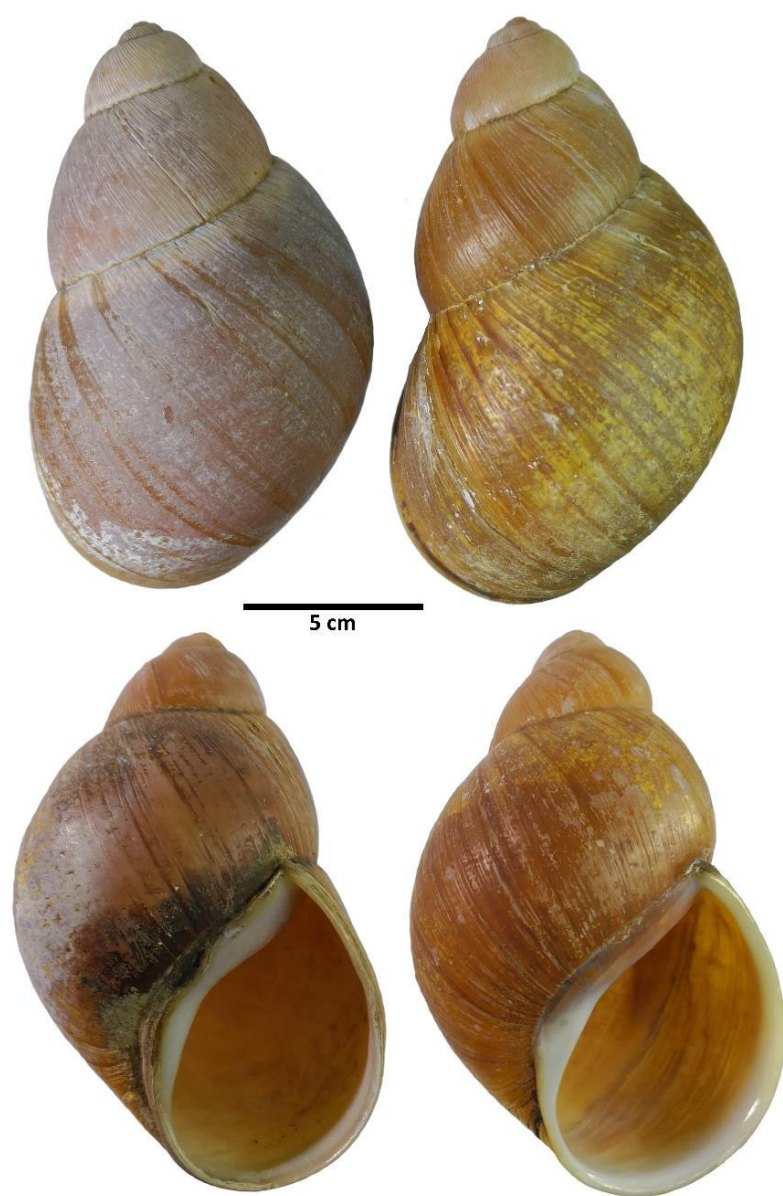
**Figura 12.** Localización en el mapa de los puntos de colecta de las diferentes poblaciones de *Megalobulimus popelairianus* que entraron en nuestros análisis. Referencia tomada de Google maps.

### ***Megalobulimus carrikeri* y *M. lichtensteini***

Los especímenes de ***M. carrikeri*** (Figura 13) fueron colectados en Chanchamayo, provincia de San Ramón, perteneciente a la región Junín, entre los años 2012 y 2013. Mientras que las muestras de ***M. lichtensteini*** (Figura 14) fueron colectadas en las localidades de Achaguay Alto (Provincia Bagua) y Poblado de Malleta (Provincia Cutervo) pertenecientes a las regiones Amazonas y Cajamarca, respectivamente.



**Figura 13.** Fotografía de individuo preservado de *Megalobulimus carrikeri*



**Figura 14.** Conchillas de *Megalobulimus lichtensteini* provenientes de Chanchamayo.

**Tabla 5.** Coordenadas de colecta de los individuos de *Megalobulimus*, codificación, procedencia y colectores.

<b>especie</b>	<b>Código</b>	<b>Región</b>	<b>Localidad</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Altitud</b>	<b>Colector, Año</b>
<b>1</b> <i>M. capillaceus</i>	W29-II	San Martín	Juan Guerra	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
<b>2</b> <i>M. capillaceus</i>	W30d	San Martín	Bellavista-Huingoyacu	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
<b>3</b> <i>M. capillaceus</i>	W33d	San Martín	Juan Guerra	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
<b>4</b> <i>M. capillaceus</i>	W34d	San Martín	Juan Guerra	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
<b>5</b> <i>M. capillaceus</i>	W35	San Martín	Juan Guerra	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
<b>6</b> <i>M. capillaceus</i>	W36d	San Martín	Juan Guerra	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
<b>7</b> <i>M. capillaceus</i>	M64d	San Martín	Juan Guerra	6°35'3.7"S	76°19'20.7"W	237 m	Rina Ramírez, 2007
<b>8</b> <i>M. capillaceus</i>	M19	San Martín	Juan Guerra	6°28'24.6"S	76°23'31.1"W	656 m	Rina Ramírez, 2007
<b>9</b> <i>M. capillaceus</i>	W31(II) d	San Martín	Bellavista-Huingoyacu	9°17'01.9"S	76°01'0.2"W	656 m	Juan Mesías & Haydee Temoche, 2017
<b>10</b> <i>M. capillaceus</i>	M50d	San Martín	Huallaga, Saposoa	6°56'21.8"S	76°46'18.8"W	318m	Rina Ramírez, 2007
<b>11</b> <i>M. capillaceus</i>	M61d	San Martín	Huallaga, Saposoa	6°56'S	76°47W		Rina Ramírez, 2007



12	<i>M. capillaceus</i>	S50d	San Martín	Huallaga	6o 56' 32.8"	76°46'18,8"W		Rina Ramírez
13	<i>M. capillaceus</i>	M16d	San Martín	Moyobamba	6°02'11.2"S	76°58'26.2"W	887m	Rina Ramírez, 2007
14	<i>M. capillaceus</i>	M22	San Martín	Rioja	6 o 04' 18,1"	77 09' 48,5"		Rina Ramírez, 2007
15	<i>M. capillaceus</i>		Lamas	Lamas	-	-	-	Rina Ramírez & Carmen Calderón
16	<i>M. capillaceus</i>	W56d	Huánuco	Tingo María, Leoncio Prado, UNAS	-	-	-	Rina Ramírez
17	<i>M. capillaceus</i>	J50d	Huánuco	Tingo María, Leoncio Prado, Castilla	9°16'39.6"S	76°00'41.9"W	747 m	Víctor Borda & Carlos Congrains, 07/10/2009
18	<i>M. popelairianus</i>	T29	San Martín	Picota. Distrito de Buenos Aires	-	-	-	Congrains C.
19	<i>M. popelairianus</i>	T30	San Martín	Picota. Distrito de Buenos Aires	-	-	-	Congrains C.
20	<i>M. popelairianus</i>	W52	San Martín	Picota. San Cristóbal de Pto Rico	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
21	<i>M. popelairianus</i>	W57	San Martín	Picota. San Cristóbal de Pto Rico	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
22	<i>M. popelairianus</i>	W59	San Martín	Picota. San Cristóbal de Pto Rico	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
23	<i>M. popelairianus</i>	W28	San Martín	Distrito Juan Guerra	-	-	-	
24	<i>M. popelairianus</i>	W53	San Martín	Distrito Juan Guerra	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
25	<i>M. popelairianus</i>	W54	San Martín	Distrito Juan Guerra				Mesías J. & Temoche H., 2017

26	<i>M. popelairianus</i>	i67	Junín	San Ramón, Mercado.			Rina Ramírez & Sergio 31/03/2012
27	<i>M. popelairianus</i>	O46III	San Martín	Tarapoto			
28	<i>M. popelairianus</i>	r92	San Martín	Tarapoto			
29	<i>M. popelairianus</i>	r90d	San Martín	Moyobamba			
30	<i>M. popelairianus</i>	r91	San Martín	Moyobamba			
31	<i>M. popelairianus</i>	H77	Loreto	Río Marañón, Bello Horizonte			Víctor Borda, 13mar13
32	<i>M. popelairianus</i>	H73	Loreto	Congompal, Saramuro			Víctor Borda, 14mar11
33	<i>M. popelairianus</i>	H75	Loreto	Río Marañón, San Pedro			Víctor Borda, 15mar12
34	<i>M. popelairianus</i>	M90	San Martín	Saposoa- Chambira	ca. 6°56'S	6°47'W	
35	<i>M. popelairianus</i>	M85	Madre de Dios	Inkaterra	12°35'S	69°05'W	Rina Ramírez & Victor Borda
36	<i>M. popelairianus</i>	N58	San Martín	Rioja	6°4'9"S	77°10'83"W	
37	' <i>M. thammianus</i> '	i66	Junín	Auvernía, San Ramón			Rina Ramírez, 31/03/2012
38	' <i>M. thammianus</i> '	N27	Madre de Dios	Inkaterra	12°35'S	69°05'W	Rina Ramírez & Victor Borda
39	' <i>M. thammianus</i> '	N39	Junín	Chanchamayo, Don Bosco	11°10'38.7"S	75°21'18.3"W	Ramírez R., Chirinos J. & Zúñiga L., 2010
40	' <i>M. thammianus</i> '	N40d	Junín	La Florida, Perené-Chanch.	10°49'54.9"S	75°06'40.9"W	Ramírez R., Chirinos J. & Zúñiga L., 2010
41	' <i>M. thammianus</i> '	N42d	Junín	La Florida, Perené-Chanch.	10°50'19.0"S	75° 06'0.8"W	Ramírez R., Chirinos J. & Zúñiga L., 2010
42	' <i>M. thammianus</i> '	r59d	Junín	-	-	-	-
43	' <i>M. thammianus</i> '	H25	Junín	Mazamari- Puerto Ocopa	11°05'39.2"S	74°18'31.3"W	Luis Zúñiga, 05/04/10

<b>44</b>	<i>M. florezi</i>	X30d	Cuzco	La Convención, Maranura, Sta. María	13°00'16.2"S	72°37'57.1"W	1215 m	Víctor Borda
<b>45</b>	<i>M. florezi</i>	X31d	Cuzco	La Convención, Echarate	12°46'11.4"S	72°32'21.7"W	1073 m	Víctor Borda
<b>46</b>	<i>M. florezi</i>	X32d	Cuzco	Quillabamba, Pavayoc: cafetal.	12°52'42.2"S	72°41'41.4"W	1094 m	Víctor Borda
<b>47</b>	<i>M. florezi</i>	X33d	Cuzco	Quillabamba, Pavayoc: cafetal.	12°53'09,8"S	72°41'41.4"W	1095 m	Víctor Borda
<b>48</b>	<i>M. florezi</i>	X34d	Cuzco	Quillabamba, Pavayoc: cafetal.	12°52'26.3"S	72°41'27,5"W	1138 m	Víctor Borda
<b>49</b>	<i>M. florezi</i>	X35d	Cuzco	Calca, La Convención	-	-	-	Víctor Borda
<b>50</b>	<i>M. florezi</i>	X36d	Cuzco	Calca, La Convención	-	-	-	Víctor Borda
<b>51</b>	<i>M. florezi</i>	J25 (2)	Cuzco	La Convención- Sta. María	13° 00' 16,2"	72° 37' 57"	1215m	Víctor Borda, 20mar12
<b>52</b>	<i>M. florezi</i>	J49	Cuzco	Quillabamba, Pavayoc: cafetal.	12°53'16.4"S	72°41'30.4"W	1203 m	Víctor Borda, 23mar13
<b>53</b>	<i>M. florezi</i>	H79	Cuzco	La Convención, Echarate	-	-	-	Víctor Borda
<b>54</b>	<i>M. lichtensteini</i>	J88*	Amazonas	Bagua: Achaguay Alto	5°35'54.8"S	78°30'00.7"W	1120 m	Juan Grados & Medina, 31/04/12
<b>55</b>	<i>M. lichtensteini</i>	J89*	Amazonas	Bagua: Achaguay Alto	5°35'36.1"S	78°29'33.5"W		Juan Grados & Medina, 31/04/12
<b>56</b>	<i>M. lichtensteini</i>	J90*	Amazonas	Bagua: Achaguay Alto	5°35'42.5"S	78°29'44.0"W		Juan Grados & Medina, 31/04/12
<b>57</b>	<i>M. lichtensteini</i>	M73	Cajamarca	Shumba,	5°32'33.07"	78°48'59.15"		

<b>58</b>	<i>M. lichtensteini</i>	N29	Amazonas	Naranjito	5°49"	78°16"		Víctor Borda & Carmen Calderón
<b>59</b>	<i>M. lichtensteini</i>	M88	Amazonas	Naranjito	5°49"	78°16"		Víctor Borda & Carmen Calderón
<b>60</b>	<i>M. lichtensteini</i>	J91	Amazonas	Bagua: Achaguay Alto	5°35'41.1"S	78°29'41.2"W	1119 m	Juan Grados & Medina, 31/04/12
<b>61</b>	<i>M. lichtensteini</i>	S46	Cajamarca	Centro Poblado de Malleta	6°06'23.5"S	78°34'32.3"W	2630 m	Rina Ramírez & Jaime Morín, dic2014.
<b>62</b>	<i>M. lichtensteini</i>	X5	San Martín	San Martín	-	-	-	Mesías J. & Temoche H., 2017
<b>63</b>	<i>M. carrikeri</i>	i54(2)	Junín	Chanchamayo, Puente Yanango	-	-	-	Rina Ramírez & Víctor Jiménez, 05mar12
<b>64</b>	<i>M. carrikeri</i>	i55d	Junín	Chanchamayo, Puente Yanango	-	-	-	Rina Ramírez & Víctor Jiménez, 05mar12
<b>65</b>	<i>M. carrikeri</i>	i56d	Junín	Chanchamayo, Puente Yanango	-	-	-	Rina Ramírez & Víctor Jiménez, 05mar12
<b>66</b>	<i>M. carrikeri</i>	i57	Junín	Chanchamayo, Puente Yanango	-	-	-	Rina Ramírez & Víctor Jiménez, 05mar12
<b>67</b>	<i>M. carrikeri</i>	i61d*	Junín	Chanchamayo, Pte Yanango	-	-	-	Rina Ramírez & Víctor Jiménez, 05mar12
<b>68</b>	<i>M. carrikeri</i>	i68d	Junín	San Ramón - Mercado	-	-	-	Rina Ramírez, 01/04/2012
<b>69</b>	<i>M. carrikeri</i>	i69d	Junín	San Ramón - Mercado	-	-	-	Rina Ramírez, 01/04/2012

(-) coordenadas no disponibles.

(\*) Estado de la muestra: ADN almacenado.



**Figura 15.** Mapa global que muestra la localización de todos los individuos colectados *Megalobulimus* muestreadas.

## 5.2. Extracción del ADN

Como se ha observado con anterioridad, en algunos grupos de caracoles resulta muy difícil lograr una correcta amplificación del ADN debido a que los mucopolisacáridos contenidos en la baba de estos organismos presentan un efecto inhibidor de la polimerasa durante la PCR (Doyle y Doyle, 1987), por ello para reducir los contaminantes tanto de muestras frescas como de muestras preservadas, se vio conveniente extraer el ADN con dos protocolos adaptados a estas condiciones, ambos a partir de 1 cm<sup>3</sup> de musculo del pie.

Un protocolo para la extracción del ADN empleó el kit de extracción E.Z.N.A® *Mollusc-DNA*® de *Omega Bio-Tek*, este procedimiento incluye homogenizar el tejido, incubar con proteinasa K y añadir cloroformo para eliminar los mucopolisacáridos. Después de una etapa rápida de precipitación con alcohol, el ADN se purifica para eliminar cualquier contaminante como sales, proteínas entre otros. Este procedimiento fue escogido en base a las propiedades del detergente catiónico, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), en conjunto con una matriz *HiBind* de unión selectiva al ADN.

El otro protocolo para la obtención de ADN está basado en la adaptación de métodos manuales de extracción de ADN a partir de CTAB (Doyle y Doyle, 1987), modificado por Ramírez (2004) para lograr la mínima presencia de sustancias inhibidoras de la amplificación durante la PCR, como suelen ser los mucopolisacáridos comúnmente encontrados en estos grupos de caracoles. El procedimiento fue como sigue a continuación:



El tejido muscular homogenizado por efecto de una fuerte presión mecánica se embebió en una solución de 300  $\mu$ L de Tris/HCl 100mM, NaCl 1.4M, EDTA 20 mM, CTAB al 2%, PVP al 2%,  $\beta$ -Mercaptoetanol al 0.2% incubada con Proteinasa K 0.05 mg a 60 °C por 2 horas. Seguido de esto, para remover las proteínas se suspendió en una solución con 310  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (96:4) y se centrifugó a 13 000 r.p.m. por 15 minutos para la obtención de dos fases, donde se recuperó la fase acuosa la cual fue transferida a otro microtubo de 1.5 mL. Se repitió este paso una vez más antes de precipitar el ADN en frío con 600  $\mu$ L de etanol absoluto y 25  $\mu$ L de Acetato de amonio 3M, luego de unos 60 minutos a -20°C, se centrifugó a 13 000 r.p.m. por 15 minutos. Finalmente se lavó el pellet obtenido repetidas veces con alcohol 96° y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas. Para su conservación se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua bidestilada o buffer y se guardó a -20 °C.

### ***Cuantificación del ADN y concentración de trabajo***

Una vez terminado el proceso de extracción, se verificó la calidad y cantidad del ADN extraído por ambos métodos mediante la cuantificación de estas en el espectrofotómetro Nanodrop Lite de *Thermo Scientific*, a partir del cual se seleccionaron las muestras a ser amplificadas usando la técnica ISSR-PCR. Como procedimiento estándar manejado en el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía y por recomendación del manual de usuario del Nanodrop, se espera que las muestras resultantes presenten una pureza entre 1.8 a 2 de absorbancia. Aquellas muestras con relaciones de ADN-proteína 260/280 menores a 1.7 fueron lavadas nuevamente con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), con el fin de diluir los compuestos

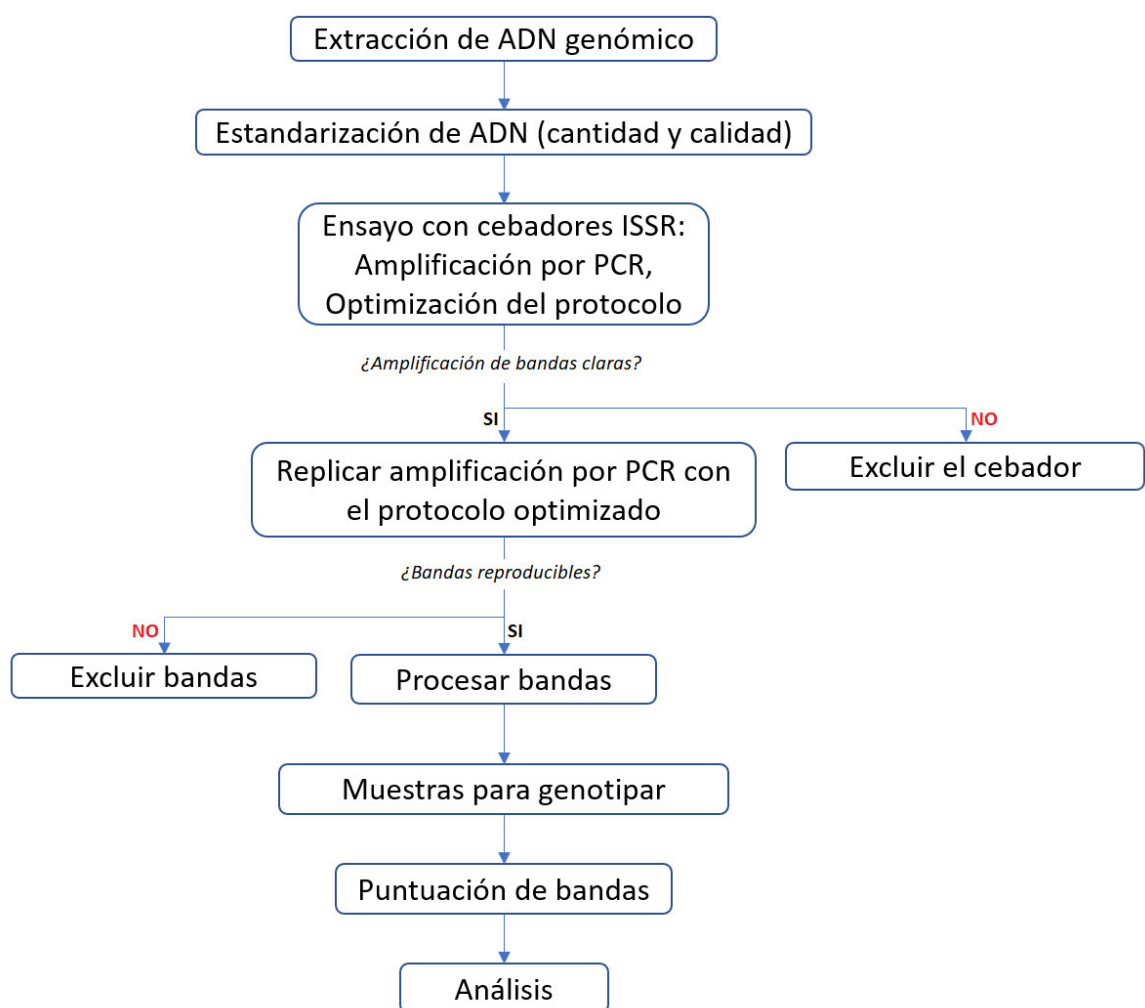
covalentes como lípidos. Las muestras que alcanzaron el rango de pureza óptimo fueron llevadas a una concentración de trabajo entre 10-15 ng/μL, las muestras con concentraciones muy elevadas (mayores a 40 ng/μL) fueron diluidas en agua bidestilada o buffer de elución según fuera el caso; por el contrario, aquellas que se encontraban a concentraciones muy bajas (menores a 8 ng/μL) fueron concentradas con el concentrador de ADN Vacufuge plus de Eppendorf.

En el caso de las muestras cuyo ADN preservado estuvo disponible para el estudio, se procedió con una cuantificación para evaluar la cantidad y pureza del material genómico. Posteriormente, con las muestras que presentaban suficiente cantidad de ADN se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.



### 5.3. Estandarización de protocolos de amplificación de ADN y electroforesis

Dado que los marcadores ISSR son sensibles a mínimos cambios de protocolo, pudiendo generar otros resultados que comprometan su reproducibilidad, a continuación, se describen los procedimientos estandarizados siguiendo las recomendaciones de Ng y Tang (2015) (Figura 16).



**Figura 16.** Proceso recomendado en flujo de caja para experimentos de genotipado con ISSR. Adaptado de Ng y Tang (2015).

### 5.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa

#### *Empleando marcadores de secuencia*

A fin de establecer una referencia para los análisis con ISSR, se buscó obtener secuencias de ADN a partir de marcadores de secuencia probados con éxito en otras especies de caracoles del Perú. Por lo tanto, se amplificó el ADN extraído empleando la técnica de PCR (Saiki *et al.*, 1988) con cebadores para el marcador 16S rRNA diseñados por Ramírez (2004), así como también se buscó amplificar parte del gen *citocromo c oxidasa* subunidad I mediante los cebadores descritos por Folmer *et al.* (1994).

Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 12.5  $\mu$ L la cual contiene: 0.1  $\mu$ L de *Taq* ADN polimerasa a 5 u/ $\mu$ L, 0.75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 1.25  $\mu$ L dNTP a 2 mM, 1.25  $\mu$ L de cada cebador a 2  $\mu$ M y 2  $\mu$ L de ADN extraído. Para la amplificación del marcador 16S rRNA, los ciclos fueron: Denaturación inicial a 96 °C por 60 segundos; a continuación 40 ciclos: Denaturación a 94 °C por 30 segundos, hibridación de los cebadores a 48 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 60 segundos, por 40 ciclos. Como control negativo de la amplificación se empleó 2  $\mu$ L de agua bidestilada en vez del ADN, manteniendo tal cual los demás componentes.

Para la amplificación del marcador COI los ciclos fueron: Denaturación inicial de 96 °C por 1 minuto, a continuación 35 ciclos: Denaturación a 95 °C por 60 segundos, hibridación de los iniciadores a 40 °C por 60 segundos y extensión a 72 °C durante 90 segundos, terminando con un paso de extensión final a 72 °C por 7 minutos.

### ***Empleando marcadores del tipo ISSR***

Los cebadores ISSR utilizados fueron obtenidos a partir de diferentes referencias en moluscos, plantas y otros animales (Tabla 6), los cuales se encuentran también en la base de datos de la Universidad de British Columbia (UBC), y fueron contrastados y mandados a sintetizar a la empresa MACROGEN INC.

**Tabla 6.** Nombres y secuencias de los cebadores (*primers*) ISSR incluidos en el análisis

	Nombre	Abrev.	Secuencia extendida	Referencia
1	UBC 808	(AG) <sub>8</sub> C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	Luo <i>et al.</i> , 2011; Dong <i>et al.</i> , 2011; Ariffin <i>et al.</i> , 2015
2	UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	Luo <i>et al.</i> , 2011; Dong <i>et al.</i> , 2011; Ariffin <i>et al.</i> , 2015
3	UBC 868	(GAA) <sub>6</sub>	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	Dong <i>et al.</i> , 2011
4	UBC 901	(CA) <sub>8</sub> RY	CACACACACACACACARY	Dong <i>et al.</i> , 2011
5	UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	ACACACACACACACACG	Luo <i>et al.</i> , 2011; Snegin, 2014
6	SAS1	(GTG) <sub>4</sub> C	GTGGTGGTGGTGC	Snegin, 2014
7	UBC 810	(GA) <sub>8</sub> T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	Kebour <i>et al.</i> , 2012
8	UBC 825	(AC) <sub>8</sub> T	ACACACACACACACACT	Luo <i>et al.</i> , 2011
9	UBC 816	(CA) <sub>8</sub> T	CACACACACACACACAT	Rocha <i>et al.</i> , 2011
10	UBC 818	(CA) <sub>8</sub> G	CACACACACACACACAG	Luo <i>et al.</i> , 2011
11	SAS 3	(GAG) <sub>4</sub> C	GAGGAGGAGGAGC	Maltagliati <i>et al.</i> , 2005
12	UBC 823	(TC) <sub>8</sub> C	TCTCTCTCTCTCTCC	Rocha <i>et al.</i> , 2011
13	K24A	(GA) <sub>8</sub> A	GAGAGAGAGAGAGAGAA	Tagizad <i>et al.</i> , 2010

Se estandarizó y optimizó la técnica de PCR para cada uno de los 13 marcadores ISSR escogidos en base a la literatura, que serían óptimos para el análisis genético en invertebrados. Para ello, se ensayó diferentes temperaturas de hibridación en cada uno de los cebadores ISSR, basadas en las condiciones de PCR manejadas: la naturaleza de la *Taq polimerasa*, la concentración de sales, concentración de ADN, secuencia, longitud de los cebadores y condiciones de hibridación como el ciclaje, algunos de estos datos fueron referidos de literatura encontrada para cada cebador.

### ***Concentración de reactivos y Temperatura de Hibridación***

El protocolo de PCR-ISSR fue optimizado a las condiciones del laboratorio, a partir de las referencias dejadas por Sane *et al.*, (2012) y Devy *et al.* (2012) para ISSR, por lo tanto, se ajustaron las concentraciones de: ADN de las muestras, los dNTPs, el MgCl<sub>2</sub>, la Taq DNA polimerasa y los cebadores ISSR.

Se ensayaron diferentes concentraciones de cloruro de magnesio (1 mM, 1.5 mM y 2 mM) en la mezcla de PCR ya que es uno de los ingredientes más sencillos de ajustar en el protocolo y que genera un mayor impacto, resultando: Para un volumen de reacción de 12.5 µL, contendría 50 ng de ADN molde, se empleó 1.25 µL de 10X buffer, 1.25 µL de dNTP [0.5mM], 2.5 µL de *primer* ISSR [2µM], 1.25 µL de MgCl<sub>2</sub> [2mM] y Taq polimerasa [0.5U].

Además, se ensayó la temperatura de hibridación para cada uno de los cebadores propuestos. La Temperatura de Fusión, T<sub>m</sub>, de un oligonucleótido es un valor de crítica importancia. Al trabajar con cebadores para ISSR, encontrar

esta temperatura por la ecuación dada por la Regla de Wallace *et al.* (1979)  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ , puede verse subestimado, dado que son secuencias microsatélites y el contenido de A-T/C-G puede ser considerablemente alto en un solo cebador. Por lo tanto, la determinación más confiable y exacta fue realizada empíricamente en un termociclador de gradiente SensoQuest.

Cada una de las reacciones de PCR con los *cebadores* de ISSR fueron realizadas con ligeras variaciones a partir del siguiente programa de ciclaje habitualmente empleado para la *Maximus Taq Polimerasa ADN*: Un ciclo inicial de denaturación 5 min a 94 °C, seguido de 37 ciclos de denaturación de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos de hibridación a 49°C-52°C (configurado para cada *primer*), 90 segundos de extensión a 72 °C y una última extensión a 72 °C por 7 minutos.

### **5.3.2. Visualización de los perfiles ISSR**

Los resultados de la amplificación fueron visualizados mediante electroforesis horizontal con buffer de corrida TBE (0.5X), los geles fueron preparados con agarosa al 2% disuelto en buffer TBE (0.5X) mezclados con 4µL de SYBR *safe*® como colorante de corrida. Para ello, se cargó 4µL de cada muestra amplificada (PCR-ISSR) mezclada previamente con 2µL del colorante azul de bromofenol ADN *Loading Dye*, 1X y para la identificación del tamaño molecular de las bandas amplificadas se empleó un marcador de tamaño molecular *GeneRuler* 100bp *ADN Ladder* con bandas de 200 a 2300 pb. Se utilizó un corriente inicial de 100 voltios durante 20 minutos seguido de 75 voltios durante 20 minutos y

finalmente 65 voltios durante 20 minutos para obtener mejor separación de las bandas.

Para la revelación del gel, se empleó un trans-iluminador de luz azul *Safe Imager 2.0 Blue Light* de Invitrogen, el cual permitió observar claramente la migración de los amplificadores en el gel, debido a que la luz azul generada por el equipo permite una clara distinción del ADN intercalado con el reactivo azul de bromofenol y el colorante de cianina, los cuales están contenidos en el *Syber Safe®*. El gel fue fotografiado con una cámara digital Canon Rebel T5i y las fotos editadas en el programa Paint.net.

Se establecieron dos tiempos para la toma de fotografías, usadas para el análisis. La primera toma ocurrió a los 20 minutos de corrida electroforética, ya que estas condiciones mostraron mejor nitidez e intensidad de las bandas, y una segunda toma a los 80 minutos, ya que se obtuvo mejor separación de bandas, aunque perdió un poco de nitidez, de manera que pudimos constatar que la asignación de bandas fue correcta.

#### **5.4. Secuenciamiento del ADN**

Se seleccionaron los productos de la PCR que presentaron una única banda correspondiente al tamaño de amplificación promedio para los cebadores de 16S rRNA (339bp) y COI (706bp). Se envió 25 µL del producto de la PCR a la compañía coreana MACROGEN INC. para su purificación y secuenciamiento mediante el método de Sanger. Se secuenciaron ambas hebras del amplicón para asegurar la calidad de los datos. Esto permitió seleccionar las muestras que

se amplificarían con *cebadores* ISSR. Se utilizó también datos de secuencias de ADN inéditas obtenidas a partir de estudios anteriores, esto para evaluar la composición y proporción de sitios informativos de cada marcador propuesto para este estudio. Estos análisis se realizaron con el programa DNAsp versión 5.0 (Librado y Rozas, 2009).

El objetivo de obtener información de los marcadores de secuencias era realizar una comparación entre los métodos, a fin de lograr una verificación de la técnica propuesta PCR-ISSR, usándolas como información de referencia.

## **5.5. Análisis molecular**

### ***Análisis de las secuencias de ADN***

El primer paso para evaluar las secuencias obtenidas de los marcadores 16S y COI fue editar contrastando con los electroferogramas en el programa Chromas Lite (McCarthy, 1996) esto con el fin de aplicar un alineamiento global con el programa ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007), la secuencia consenso y edición de las secuencias se realizó con el programa Mega7 (Kumar *et al.*, 2016). Para realizar una rápida verificación de las secuencias, todas fueron corridas con la herramienta online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la Base de Datos del GenBank (NCBI). Es importante mencionar que también se aprovechó material genético disponible en la base de datos del laboratorio (provenientes de secuenciamientos previos), que ayudaron a complementar los análisis.

### ***Duplicación, aleatorización y reproducibilidad***

A fin de garantizar la reproducibilidad de la técnica, se generaron perfiles replicados o duplicados de ISSR, a partir de extracciones separadas de ADN de un solo individuo, para al menos 10% de todas las muestras. Estos representaron todos los tratamientos (por ejemplo, el método de extracción de ADN, PCR, electroforesis, tiempo almacenado en el refrigerador, etc). Esto es de crucial importancia para ISSR, porque las repeticiones son la medida objetiva de evaluar calidad (a diferencia del secuenciamiento de ADN, donde los nucleótidos correctos se pueden determinar con un alto grado de confianza). En los ensayos se procuraron incluir muestras ya reveladas (controles positivos) para verificar este punto, y además emplearlos referencia.

### ***Construcción de matrices para cada marcador ISSR***

Debido a que los ISSR son marcadores dominantes, se asumió que cada banda representa un solo locus bi-alélico. Luego se construyó una matriz binaria a partir de los productos amplificados por cada *primer* ISSR para cada especie, es decir, se asignó una puntuación por cada banda visualizada sobre el gel, (1 presencia y 0 ausencia). Esto permite ordenar los datos de forma que el programa pueda considerar cada valor como si se tratara de un sitio informativo, como en el caso de los marcadores de secuencia, y continuar con los procedimientos de manera regular.





**Figura 17.** Anotación de bandas para la creación de matriz binaria. Adaptado de Tan y Ng (2015).

Las matrices fueron hechas en Excel y convertidas a formato Nexus con el software Mesquite (Maddison y Maddison, 2001), donde se pudo construir dendogramas de distancias genéticas.

En este estudio se consideró cada posición de banda como un locus, de manera que el número total de bandas es el total de loci obtenidos, y las bandas polimórficas se consideraron como aquellas que presentaron variación en presencia y ausencia según cada muestra analizada, entendiendo por lo tanto, que una banda no polimórfica es aquella compartida entre todas las muestras.

El cálculo del porcentaje de bandas polimórficas estuvo dado por la siguiente formula:

$$\% \text{ de bandas polimórficas} = \frac{\text{Nº de bandas polimórficas}}{\text{Total Nº de bandas}} \times 100\%$$

### ***Evaluación de la calidad de los datos***

Los cálculos hechos en Excel para estimar la eficiencia de la técnica PCR-ISSR empleada son los siguientes:

La **potencia de resolución (Rp)** de cada cebador ISSR, indica el potencial discriminatorio de los cebadores aplicados, se calculó basándose en la fórmula de Prevost y Wilkinsin (1999):

$$R_p = \sum I_b,$$

donde  $I_b$  es la información de la banda.  $I_b$  se calcula a través de

$$I_b = 1 - [2 \times (0.5 - p)]$$

donde  $p$  es la proporción de los genotipos que contienen la banda.

El **contenido de información polimórfica**, representado por el valor de **PIC**, para cada locus polimórfico se calculó de acuerdo con Roldán-Ruiz *et al.* (2000):

$$PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$$

donde  $f_i$  es la frecuencia de los fragmentos (bandas) presentes en ese locus.

Todos estos cálculos se hicieron de forma manual en Excel para cada marcador ISSR.

### ***Estimación de la diversidad genética***

Para medir distancia genética por pares, (basado en la distancia genética no sesgada de Nei entre poblaciones (Nei, 1978)), el índice de diversidad genética ( $H_e$ ), el índice de información de Shannon ( $I$ ), el número efectivo de alelos ( $N_e$ ) y el porcentaje de loci polimórficos, se empleó el software GenAlEx 6.5.

Se realizó el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para evaluar la varianza encontrada entre y dentro de las poblaciones, dando una indicación de la variación entre las especies (Excoffier *et al.*, 1992). Para ello se empleó el software GenAlEx 6.5 configurado para datos haploides de marcador dominante.

Donde la probabilidad está dada por  $\Phi_{PT}$ ,  $P$  (rand  $\geq$  datos), para  $\Phi_{PT}$  está basado en la permutación estándar en todo el conjunto de datos.

$$\Phi_{PT} = \frac{AP}{(WP + AP)}$$

$$\Phi_{PT} = \frac{AP}{Total}$$

Donde:

AP = Estimación de la varianza entre las poblaciones, WP = Estimación de la varianza dentro de las poblaciones.

Para el caso de las poblaciones de *M. capillaceus* y *M. popelairianus*, los métodos de diagnóstico de diversidad genética y distancia fueron realizados tomando todos los loci de los seis marcadores ISSR, a fin de determinar si existía estructuración poblacional. Asimismo, se calcularon otros parámetros estadísticos que incluyen el número de loci polimórficos (PL), el porcentaje de loci polimórficos (PPL), mediante cálculos directos en Excel.

### ***Construcción de dendogramas***

Para determinar la diferenciación intraespecífica entre las poblaciones de *M. capillaceus*, así como también entre las poblaciones de *M. popelairianus sensu lato* se construyó dendogramas basados en distancia, por el método UPGMA (Rohlf y Sokal, 1981), este mismo procedimiento se realizó para analizar las distancias globales entre especies de *Megalobulimus* estudiadas en la presente tesis.

La calidad de la agrupación de los taxa, se determinó mediante el coeficiente de correlación ( $r$ ) en base al análisis de conglomerados UPGMA. Algunos

cladogramas fueron desarrollados por el método Neighbor-Joining, el soporte de las ramas fue evaluado mediante *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas. Todos estos cálculos se llevaron a cabo mediante el paquete de software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estandarización de los protocolos moleculares

#### *Extracción del ADN y concentración inicial de ADN genómico*

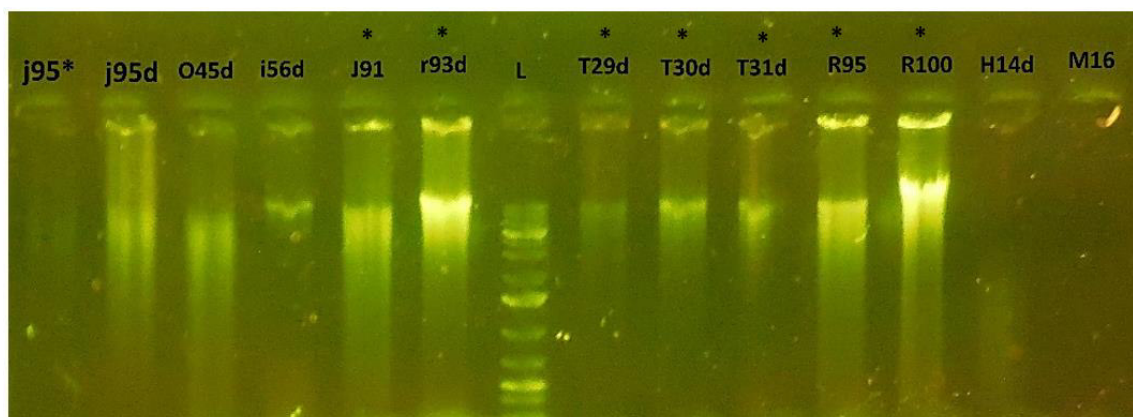
Se obtuvo extracciones de ADN de todas las especies propuestas, *M. popelairianus*, '*M. thammianus*', *M. capillaceus*, *M. carrikeri*, *M. lichteinsteini*; incluyendo las muestras de *M. florezi* procedentes del MUSM que se encontraban preservadas en alcohol 96%.

La concentración de ADN genómico extraído con el kit *Mollusc* ADN estuvo entre 100 y 400 ng/ $\mu$ L, con niveles de pureza  $\Delta 260/280$  entre 1.8 y 2.0 resuspendido en un volumen total de 60  $\mu$ L de buffer de elución del mismo kit. Con un ligero contraste, la cuantificación de las extracciones realizadas con el método CTAB dio valores más altos en concentración de ADN por microlitro, que los extraídos por kit, pero en algunos casos al tratarse de muestras antiguas no presentaron una buena calidad de ADN; además, se puede notar que las muestras de ADN conservadas (previa extracción) se encontraron en un estado aceptable de concentración y pureza (Tabla 7), sin embargo, fue importante comprobar también la integridad del ADN mediante una corrida electroforética (Figura 18).

Luego de la extracción del ADN se normalizó la cantidad mediante diluciones que alcanzaron valores entre 10 ng/ $\mu$ L y 15 ng/ $\mu$ L, los cuales demostraron ser óptimos para obtener perfiles de ISSR. Valores mayores causaban manchas en los geles y bandas no definidas.

En la Tabla 6 se detallan los resultados de las extracciones, en asterisco (\*) se especifican los individuos extraídos a partir de ADN antiguo (preservado del MUSM-UNMSM).

En la figura 18 se presenta uno de los geles resultantes de las diferentes electroforesis que se hicieron para evaluar la integridad del ADN preservado de muestras de *Megalobulimus*. Muchas de las muestras disponibles de estudios anteriores no estaban en condiciones óptimas de integridad, por lo que se seleccionó solo las que presentaban bandas intensas, de gran peso molecular, y sin degradación aparente. Por ello, en las secciones siguientes se muestran resultados de una menor cantidad de muestras que las 69 incluidas y evaluadas inicialmente.



**Figura 18:** Electroforesis de ADN genómico de individuos preservados. Gel de agarosa 1% (95V, 22 min). Marcador de tamaño molecular (L) *Thermo Scientific* #SM1331. Muestra que la calidad del ADN preservado no fue óptima (En asterisco se indican las muestras de trabajo).

**Tabla 7.** Cuantificación de ADN de las muestras trabajadas. Cuantificación realizada antes y después de las diluciones. En asterisco (\*) se especifican los individuos extraídos a partir de ADN preservado.

Especie	Muestras	[ng/μL]i	Δ260/280	[ng/μL]f
<i>M. florezi</i>	X30d *	57.6	1.8	10.6
	X31d *	22.8	1.75	10.5
	X32d *	17.9	1.32	11.6
	X33d *	29.4	1.79	10.5
	X34d *	148.5	1.8	10.7
	X35d *	140.5	1.8	10
	X36d *	313.1	1.82	10.1
	X37 *	255.1	1.84	10.2
	J25 (2)	4.2	1.5	10.9
	J49	54.5	1.5	10.6
	H79	2.6	1.78	10.8
<i>M. popelairianus</i>	r90d	350	1.87	14.9
	r91	325	1.92	15
	o46iii	100	1.80	14.8
	i67	22	1.79	10.5
	t29d	27	1.99	10.6
	X1	590.5	1.84	15
	W52	520	1,91	15
	W53ii	880.8	1.86	15
	W54ii	769	1,92	15
	W27d	67,2	1,98	14.9
	W28d	239	2	15
<i>M. capillaceus</i>	W29	219	2	15
	W30	165	2	14.89
	W31	142.5	2,1	15.1
	W33	13.9	1.85	13.9
	W34	105.5	1,94	15.5
	W36ii	102.5	1,91	14.8
	W56ii	425	1.91	15

<i>M. lichtensteini</i>	X2	115	1.95	14.5
	X3	150	1.92	14.3
	X4	125	1.94	14.5
	J88*	45.6	1.76	12.5
	J89*	35.4	1,72	12.6
	J90*	6.5	1.86	12.3
	J91	89	1.73	13.5
	S46	400	1.85	12.5
<i>M. carrikeri</i>	X5	114,5	2.01	12.5
	i55d	24.9	1.89	14.1
	i56d	37,5	1.96	11
	i54(2)	12.8	1.88	12.8
	i68d	12,6	1.92	12.9
	i69d	69.5	1.97	10
	i57	50	1.82	10
	i61d	12.5	1.96	12.5
	r93	420	1.68	11.2
	J95d	101	1.56	10.6
' <i>M. thammianus</i> '	i66	8.56	1.8	10.5
	N42d	32.7	1.92	12.5
	r59d	46.2	1.83	16.2
	N40d	28.2	1.87	14.8
	H25	4.6	1.7	10.6

### ***Amplificación por PCR con cebadores ISSR***

El protocolo de PCR-ISSR optimizado a las condiciones del laboratorio para cada uno de los reactivos, se aprecia en la tabla 8.

Si bien la mayoría de trabajos de ISSR en moluscos se ha realizado a concentraciones de 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> con éxito (Dong *et al.*, 2011), la



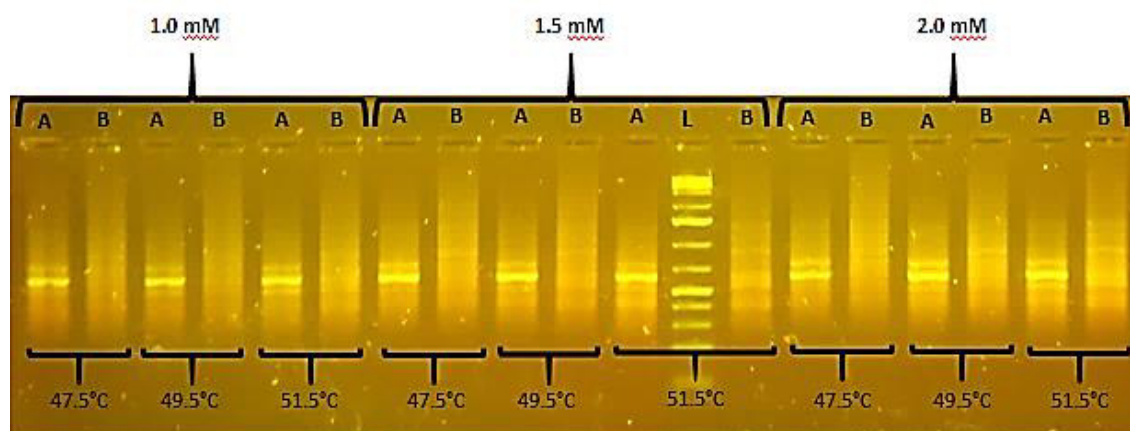
concentración de magnesio que mejores resultados produjo en cuanto a cantidad de bandas y mejor resolución fue 2.0 mM (Figura 19), por lo tanto, se optó por mantener esta concentración para la replicación de bandas, posteriormente, traducidas a matrices binarias.

**Tabla 8.** Condiciones finales de la mezcla de PCR estandarizada en este estudio.

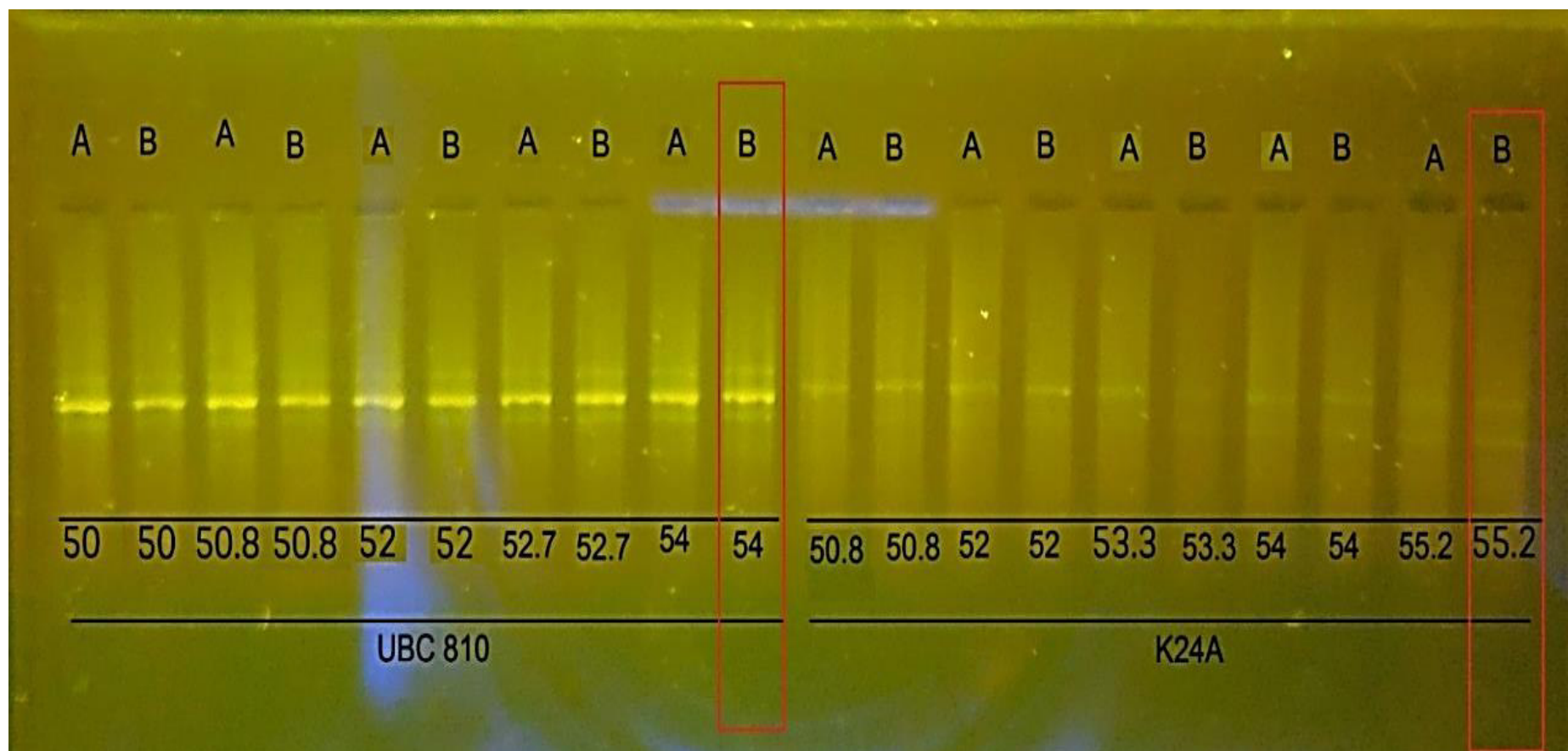
Reactivo	Concentración Final	Volumen Final
H <sub>2</sub> O	-	5.55 µl
Buffer TB	1X	1.25 µl
dNTPs	0.2 mM	1.25 µl
Cebador	0.4 µM	2.50 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM/ 1.5 mM	1.25 µl
Taq Polimerasa	0.08 U/µl	0.20 µl
ADN	5 – 20 ng/µl	0.50 µl
TOTAL	-	12.5 µl

El ensayo de gradiente de temperaturas de hibridación para la amplificación mediante PCR, revelado en geles de agarosa al 2% (Figura 20), dio un rango entre 51°C - 55.5°C para 13 cebadores del tipo ISSR, como se observa detalladamente en la Tabla 9, esto nos permitió discriminar entre los cebadores según la cantidad de bandas reproducibles que se podían obtener por cada uno, dada la naturaleza de nuestras muestras. Por lo cual, se escogieron 6 cebadores

(Tabla 10) debido a que éstos presentaron las bandas más nítidas y mucho mejor nivel de resolución dada las condiciones ya mencionadas.



**Figura 19.** Ensayo de condiciones de  $MgCl_2$  mediante el marcador ISSR UBC 810. Se usaron tres concentraciones de sales (1.0 mM, 1.5 mM y 2.0 mM) y tres condiciones de temperatura. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.



**Figura 20.** La temperatura óptima de hibridación del marcador UBC 810 fue 54°C ya que se evidenciaron más bandas a la vez que mostraron más nitidez, el mismo fenómeno se observó con el resto de cebadores que finalmente fueron empleados en los análisis. Muestra A corresponde a un individuo de *M. carrikeri* y muestra B a un individuo de *M. popelairianus*.

**Tabla 9.** Ciclaje estandarizado para las reacciones de PCR en cada marcador ISSR, usando la *Taq polimerase*.

Marcador	Motivo	Ciclaje en Termociclador	T <sub>m</sub> (°C)
<b>SAS1</b>	(GTG) <sub>4</sub> C	[94°C (40'') + 55°C (45'') + 72°C (70'')] <sup>x45</sup>	55.5
<b>SAS3</b>	(GAG) <sub>4</sub> C	[94°C (40'') + 55°C (45'') + 72°C (70'')] <sup>x45</sup>	55.5
<b>UBC811</b>	(GA) <sub>8</sub> C	[94°C (40'') + 52.5°C (55'') + 72°C (70'')] <sup>x40</sup>	52.5
<b>UBC823</b>	(TC) <sub>8</sub> C	[94°C (40'') + 54°C (50'') + 72°C (65'')] <sup>x40</sup>	54
<b>UBC825</b>	(AC) <sub>8</sub> T	[94°C (40'') + 54°C (50'') + 72°C (65'')] <sup>x40</sup>	54
<b>UBC840</b>	(GA) <sub>8</sub> TT	[94°C (40'') + 54°C (60'') + 72°C (75'')] <sup>x40</sup>	54
<b>UBC 808</b>	(AG) <sub>8</sub> C	[94°C (40'') + 55°C (45'') + 72°C (60'')] <sup>x45</sup>	55
<b>UBC 868</b>	(GAA) <sub>6</sub>	[94°C (40'') + 55°C (45'') + 72°C (70'')] <sup>x45</sup>	50
<b>UBC 901</b>	(CA) <sub>8</sub> RY	[94°C (30'') + 52.5°C (50'') + 72°C (60'')] <sup>x40</sup>	52.5
<b>UBC 810</b>	(GA) <sub>8</sub> T	[94°C (30'') + 54°C (50'') + 72°C (60'')] <sup>x40</sup>	54
<b>UBC 816</b>	(CA) <sub>8</sub> T	[94°C (30'') + 54°C (50'') + 72°C (60'')] <sup>x40</sup>	51
<b>UBC 818</b>	(CA) <sub>8</sub> G	[94°C (30'') + 54°C (55'') + 72°C (60'')] <sup>x40</sup>	48
<b>K24A</b>	GA <sub>8</sub> A	[94°C (30'') + 54°C (55'') + 72°C (60'')] <sup>x40</sup>	55

**Tabla 10.** Marcadores ISSR seleccionados para los análisis realizados en este estudio y sus respectivos motivos genéticos

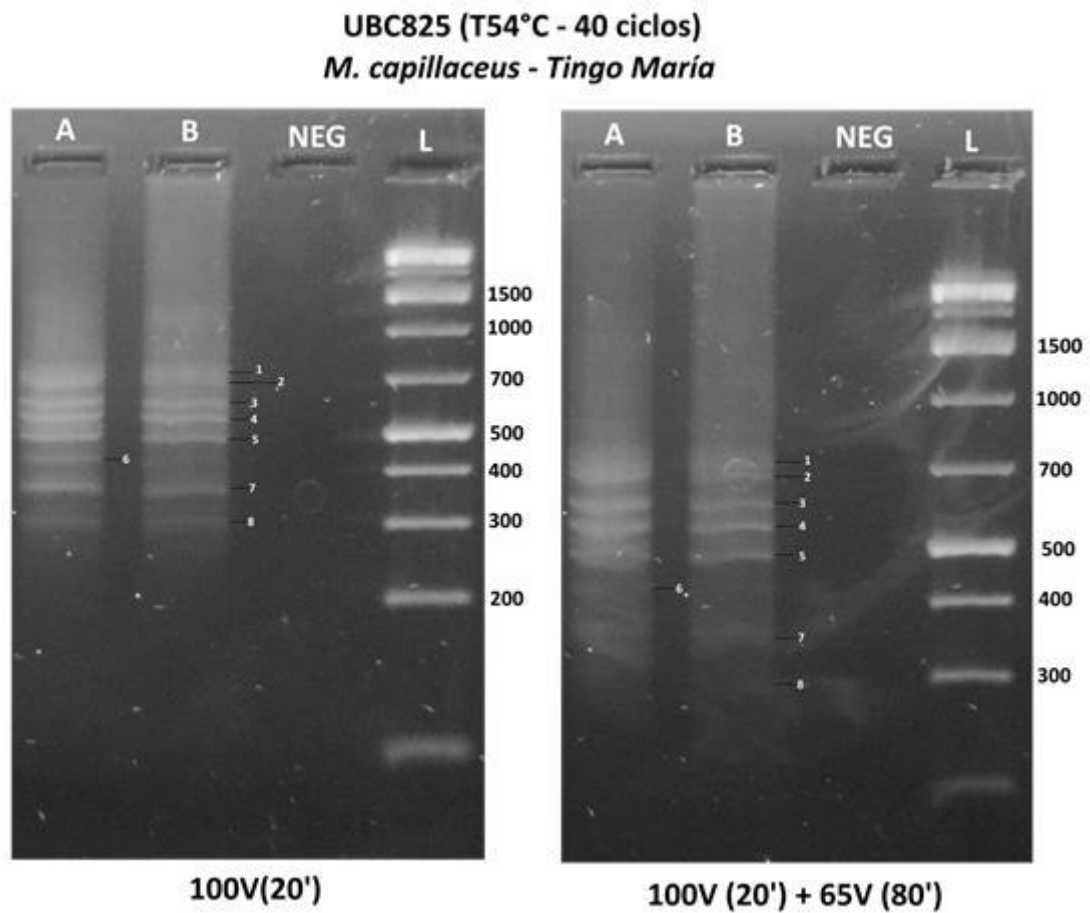
MARCADOR	MOTIVO
UBC825	(AC) <sub>8</sub> T
UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C
UBC 823	(TC) <sub>8</sub> C
SAS1	(GTG) <sub>4</sub> C
SAS3	(GAG) <sub>4</sub> C
UBC840	(GA) <sub>8</sub> TT

#### ***Visualización de perfiles ISSR mediante electroforesis***

Las fotografías empleadas para el análisis fueron tomadas luego de la corrida electroforética por 80 minutos a 65 voltios en un gel de agarosa 2% ya que estas condiciones mostraron la mejor relación de separación de las bandas sin perder nitidez.

Normalmente se recomienda aumentar el tiempo de electroforesis para separar las bandas lo suficiente y poder clasificarlas sin errores. En la figura 21 se puede observar las diferencias en la resolución de las bandas ISSR a diferentes tiempos de electroforesis. La foto tomada en los primeros 20 minutos muestra mayor nitidez y presencia de bandas, pero se encuentran menos separadas entre ellas por lo que resulta difícil el análisis y la comparación de los patrones de bandas entre poblaciones de *M. capillaceus*. Al esperar más tiempo (80 minutos) observamos mejor separación de las bandas, pero se perdió la nitidez e incluso se perdieron las bandas más pesadas (bandas 6, 7 y 8).

Por este motivo, para la construcción de las matrices detallando presencia/ausencia de banda, se emplearon ambas tomas en comparación para cada marcador, a fin de evitar el mínimo error.



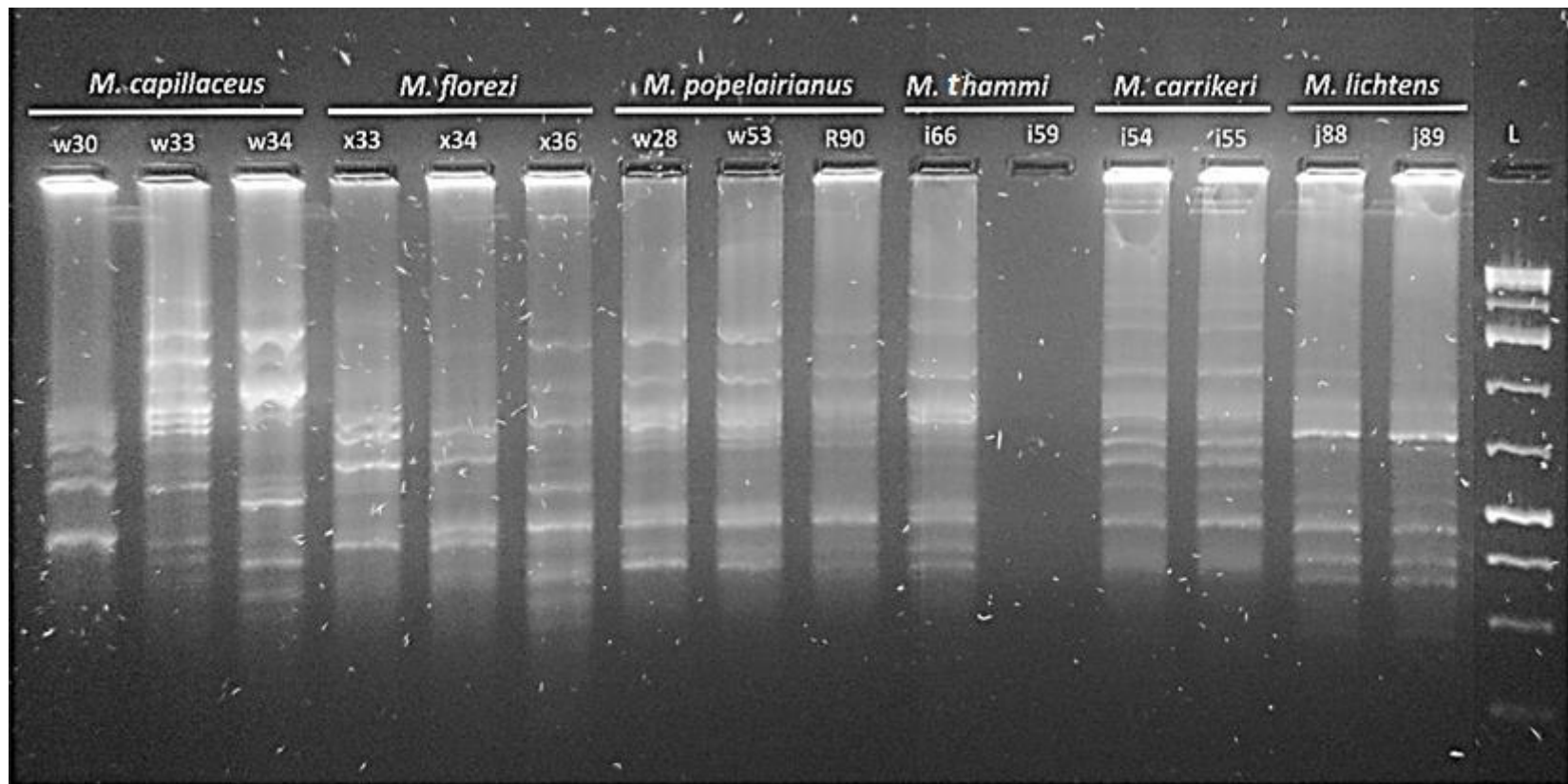
**Figura 21.** Resolución de las bandas ISSR comparadas en diferentes tiempos de electroforesis, para la población de Tingo María de *Megalobulimus capillaceus* empleando el marcador UBC 825. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.

## **6.2. Comparación de los perfiles ISSR entre distintas especies de *Megalobulimus***

Se pudo seleccionar al menos dos muestras de cada especie para el análisis de ISSR en el género *Megalobulimus*. Además, se emplearon muestras provenientes de todas poblaciones posibles de *M. popelairianus* y *M. capillaceus* para los análisis dentro de esas especies.

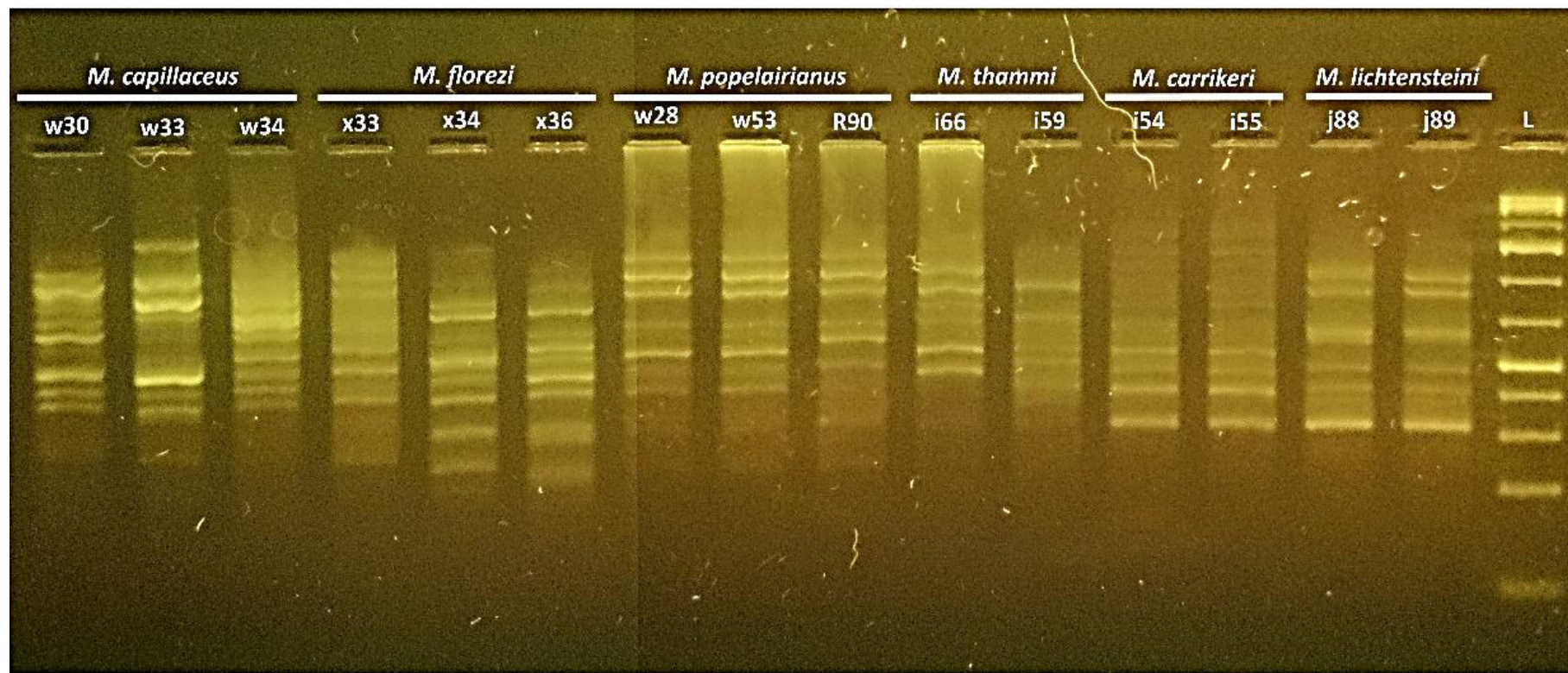
Los perfiles obtenidos fueron fáciles de discriminar entre especies, variando en cada una según el número y tamaño de las bandas. En total se obtuvieron 166 bandas, siendo el marcador SAS1 el que produjo más posiciones de bandas con 37 sitios en total. (Figuras 22 – 28)

Uno de los aportes de este trabajo es revelar diferencias genéticas entre las especies *M. florezi* y *M. capillaceus*, las cuales han sido difíciles de lograr en trabajos previos empleando marcadores de secuencia. En la figura 28, se observa que, bajo la amplificación del cebador UBC 825, tanto la especie *M. florezi* como *M. capillaceus* presentan patrones distintos claramente distinguibles y con bandas conservadas para cada grupo.

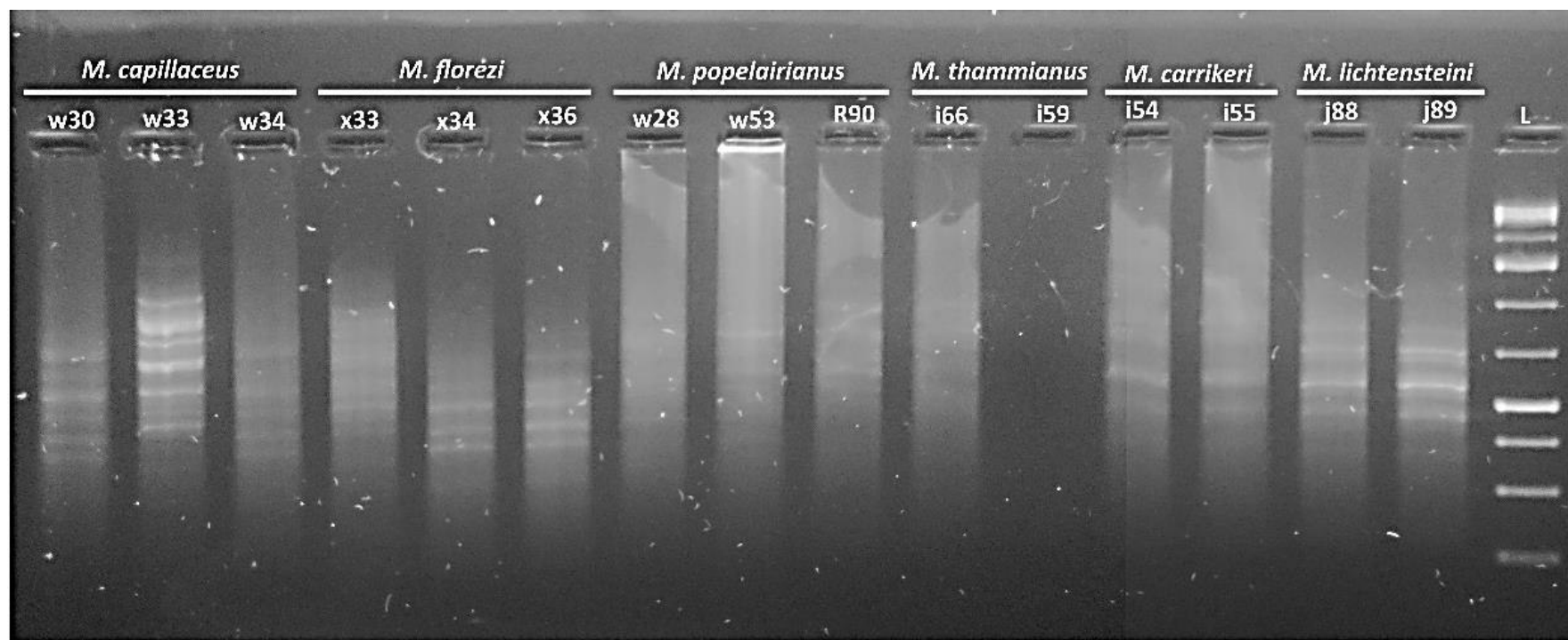


**Figura 22.** Perfiles de ISSR de las seis especies *Megalobulimus* obtenidos a partir del marcador SAS 1. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.

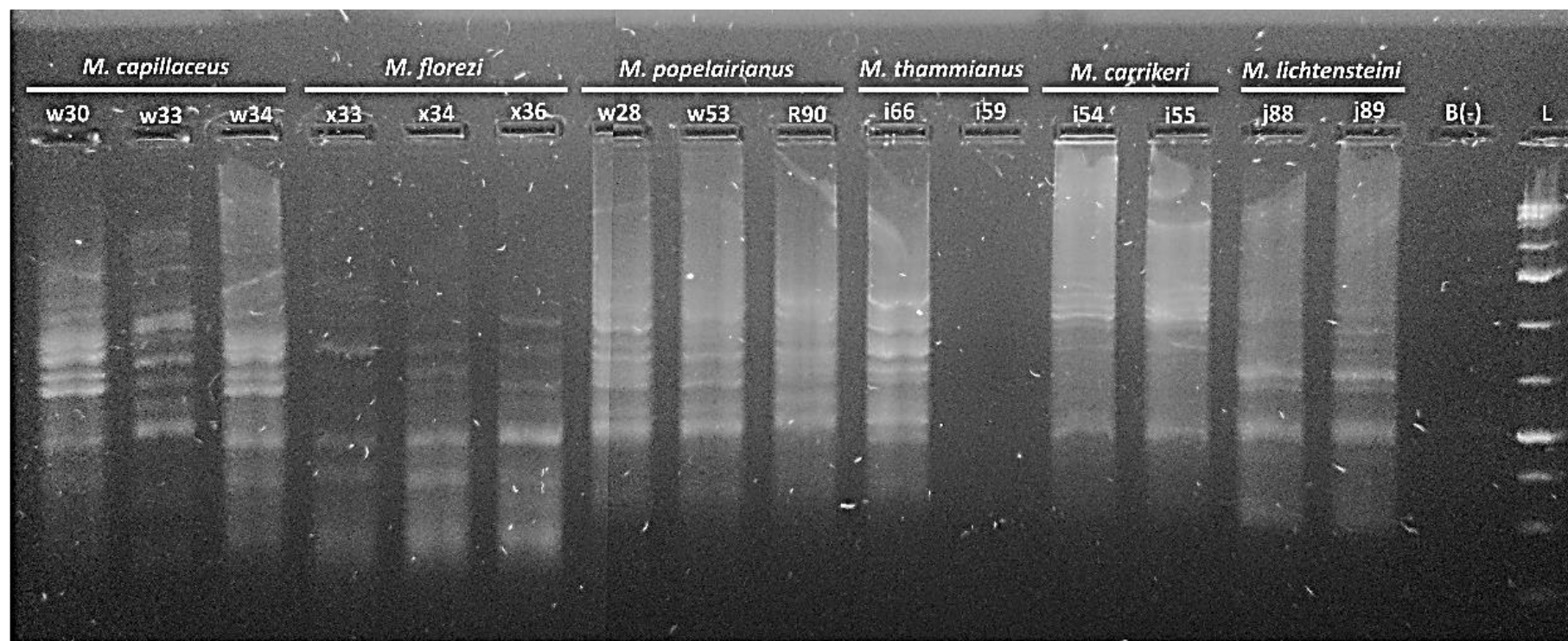




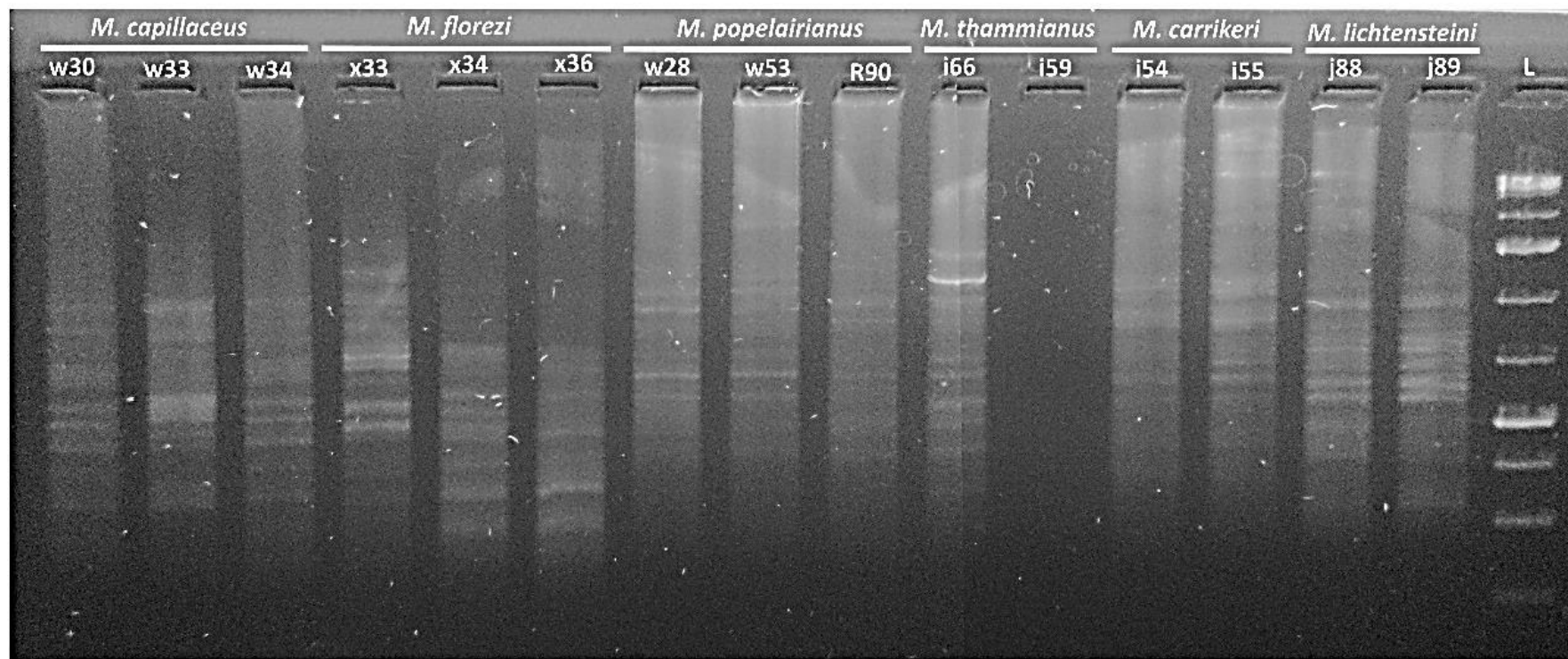
**Figura 23.** Perfiles de ISSR para las seis especies *Megalobulimus* obtenidos a partir del marcador SAS 3. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.



**Figura 24.** Perfiles de ISSR de las seis especies *Megalobulimus* obtenidos a partir del marcador UBC 811. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.

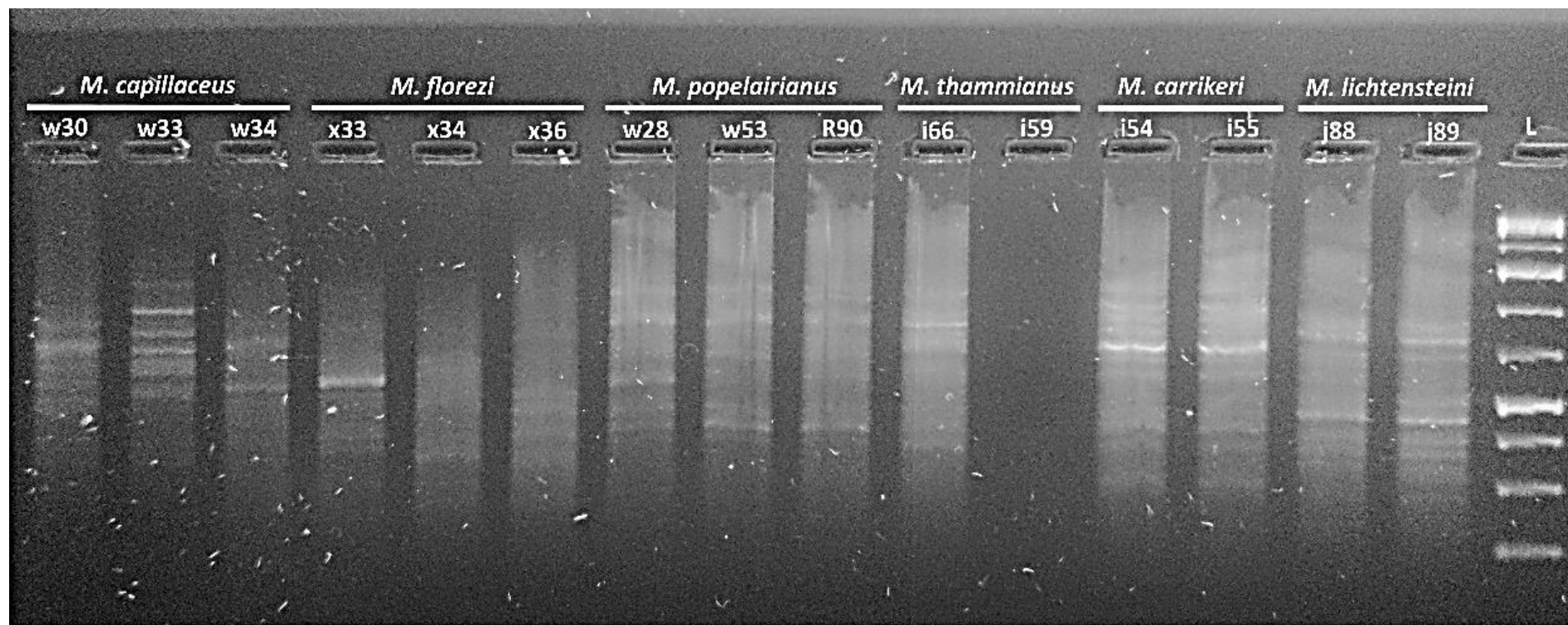


**Figura 25.** Perfiles de ISSR de las seis especies *Megalobulimus* obtenidos a partir del marcador UBC 823. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.

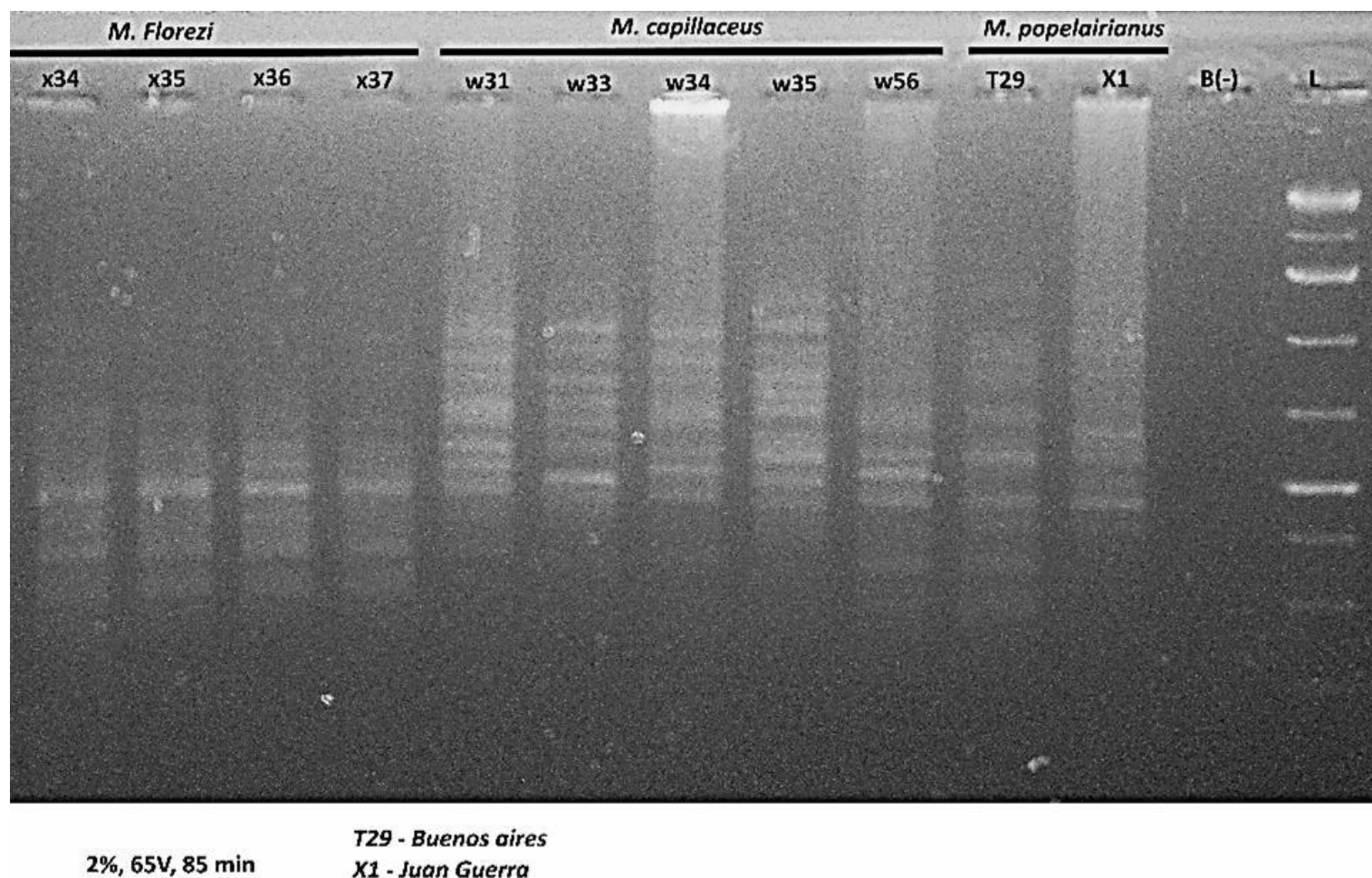


**Figura 26.** Perfiles de ISSR de las seis especies *Megalobulimus* obtenidos a partir del marcador UBC 825. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.





**Figura 27.** Perfiles de ISSR de las seis especies *Megalobulimus* obtenidos a partir del marcador UBC 840. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.

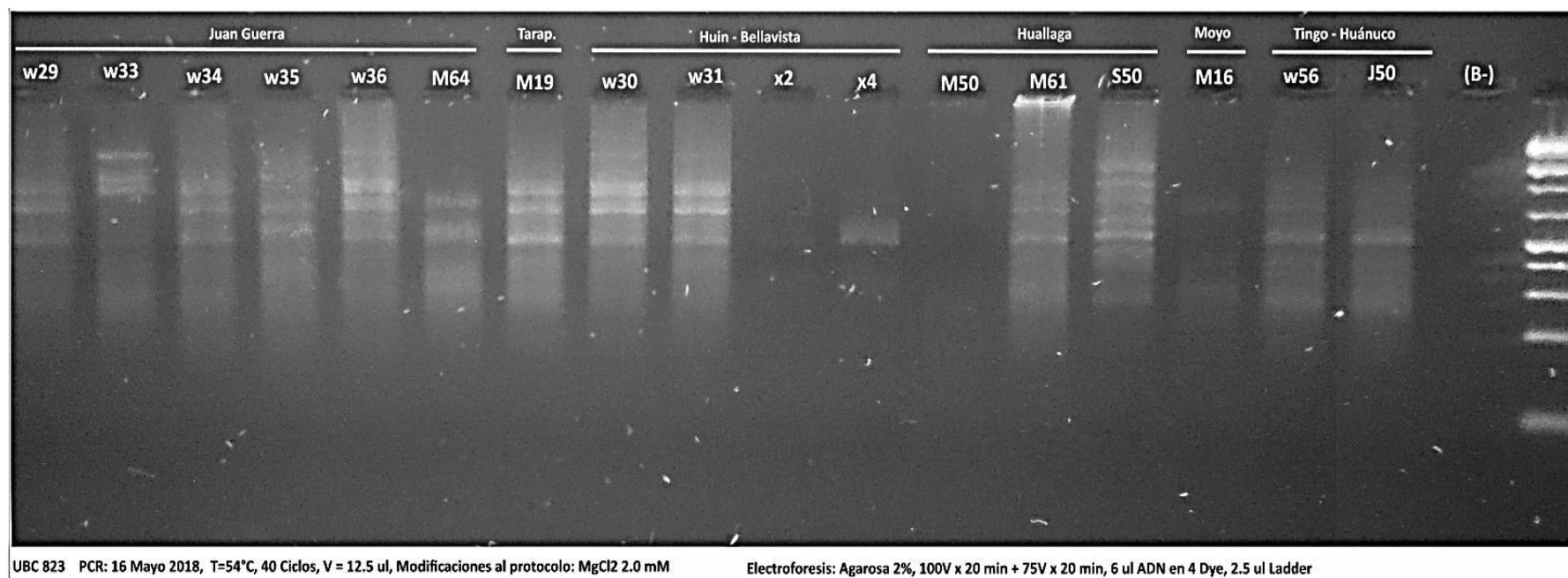


**Figura 28.** Patrones ISSR obtenidos con el cebador UBC 825. Marcador de tamaño molecular (Thermo Scientific #SM1331). Esta fotografía representa el primer ensayo de ISSR obtenido en *M. florezi* y *M. capillaceus*, evidenciando claramente dos grupos marcados que no fueron discriminados por marcadores de secuencia. El tiempo de corrida fue mayor al de los ensayos incluidos en los análisis bioinformáticos.

### **6.3. Perfiles ISSR en poblaciones de la especie *M. capillaceus***

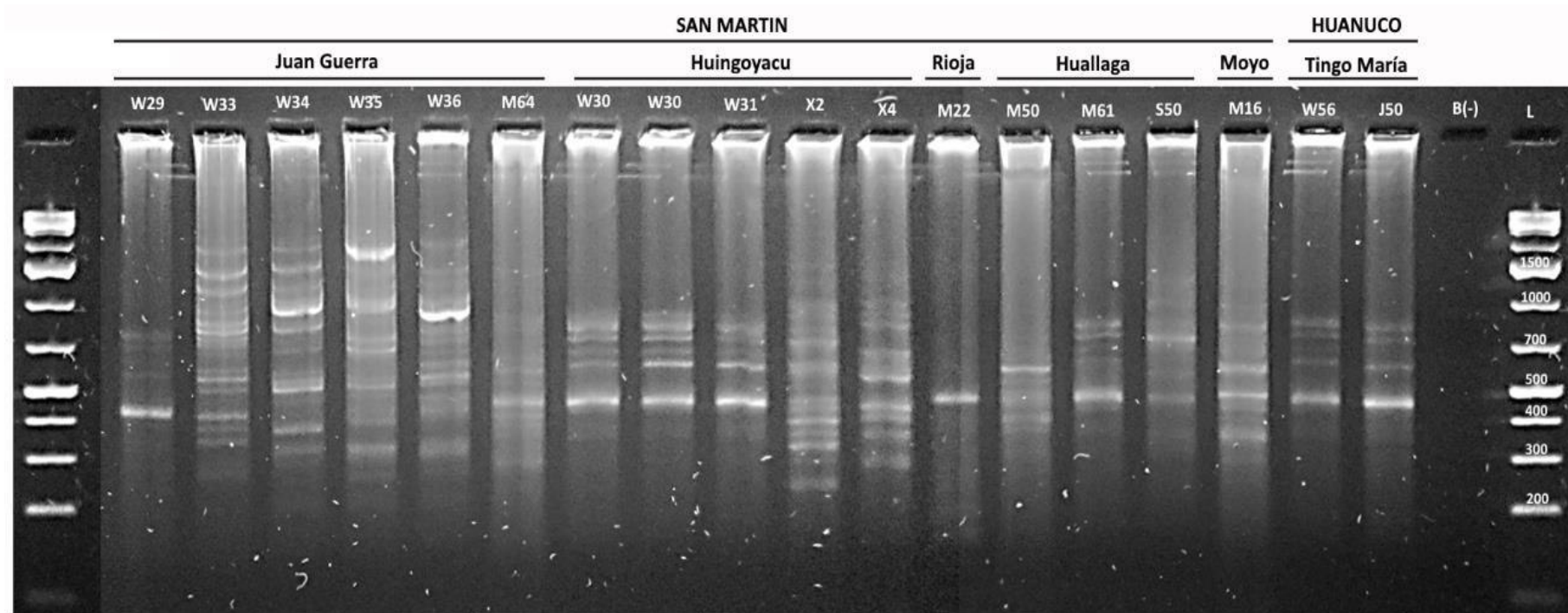
Al analizar divergencia intraespecífica de *M. capillaceus* se evidenció gran diversidad de patrones ISSR, muchos de ellos compartidos dentro de las poblaciones. Los individuos procedían de 7 localidades diferentes, sin embargo, por disponibilidad de la muestra de ADN de Tarapoto solo se pudo obtener el perfil ISSR de esta población en la mitad de los análisis (SAS1, UBC823, UBC840).

En total se obtuvieron 104 bandas, siendo el marcador SAS1 el que produjo más posiciones de bandas con 23 sitios en total, por el contrario, el que produjo menos posiciones fue el marcador UBC823 (Figuras 29-34).

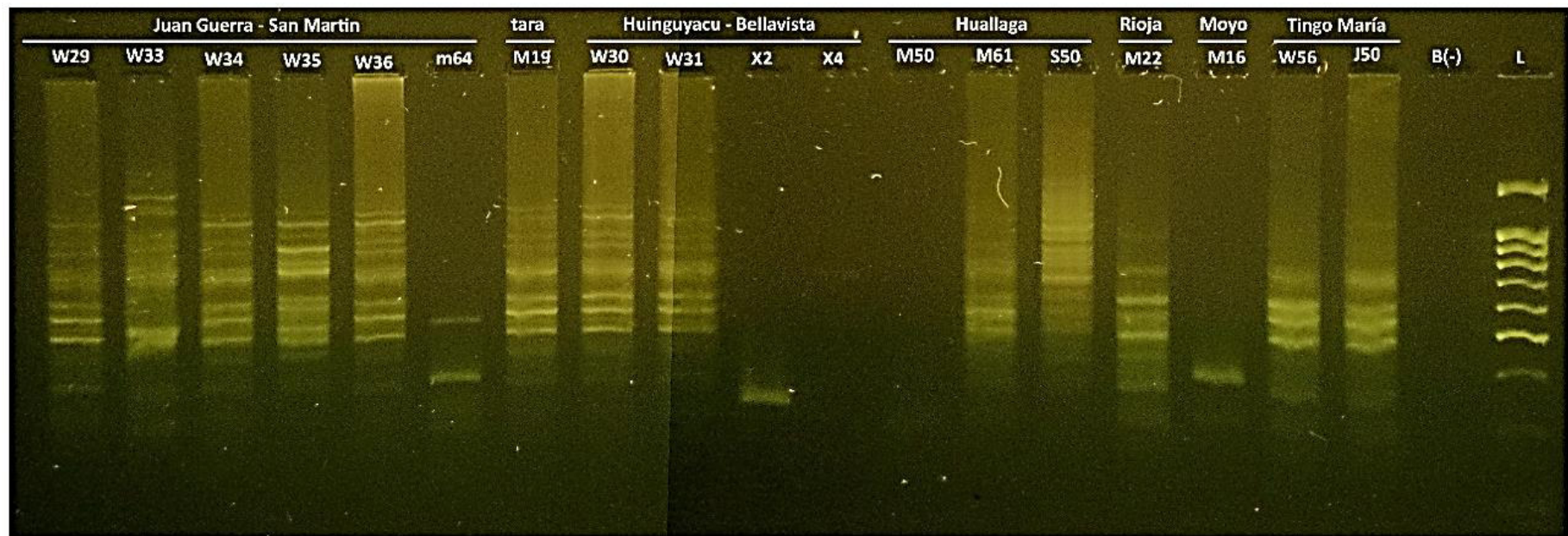


**Figura 29.** Perfiles ISSR de *M. capillaceus* procedentes de siete localidades, empleando el marcador UBC 823. Se encontraron en total 9 posiciones de bandas. Marcador de tamaño molecular (último carril) Thermo Scientific #SM1331. Excepcionalmente la mejor foto fue obtenida a 40min de corrida para este ensayo.

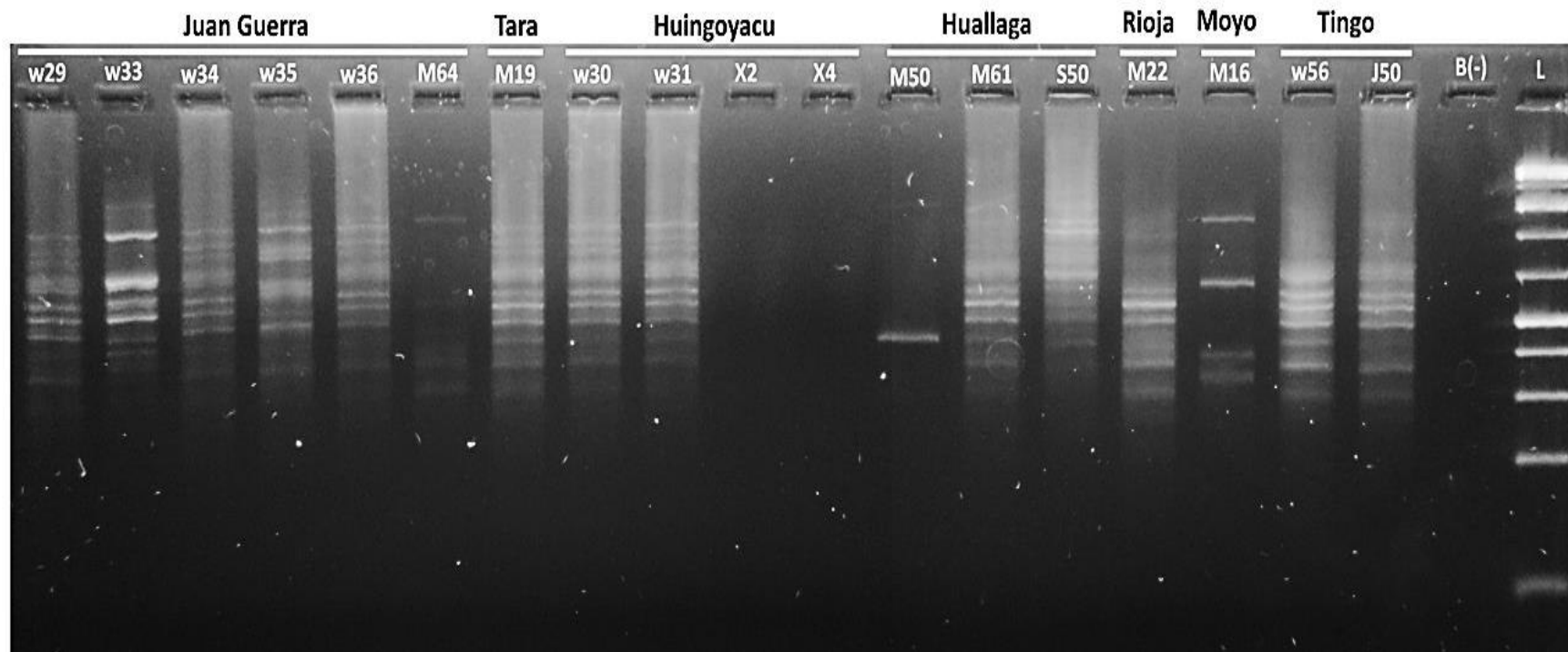




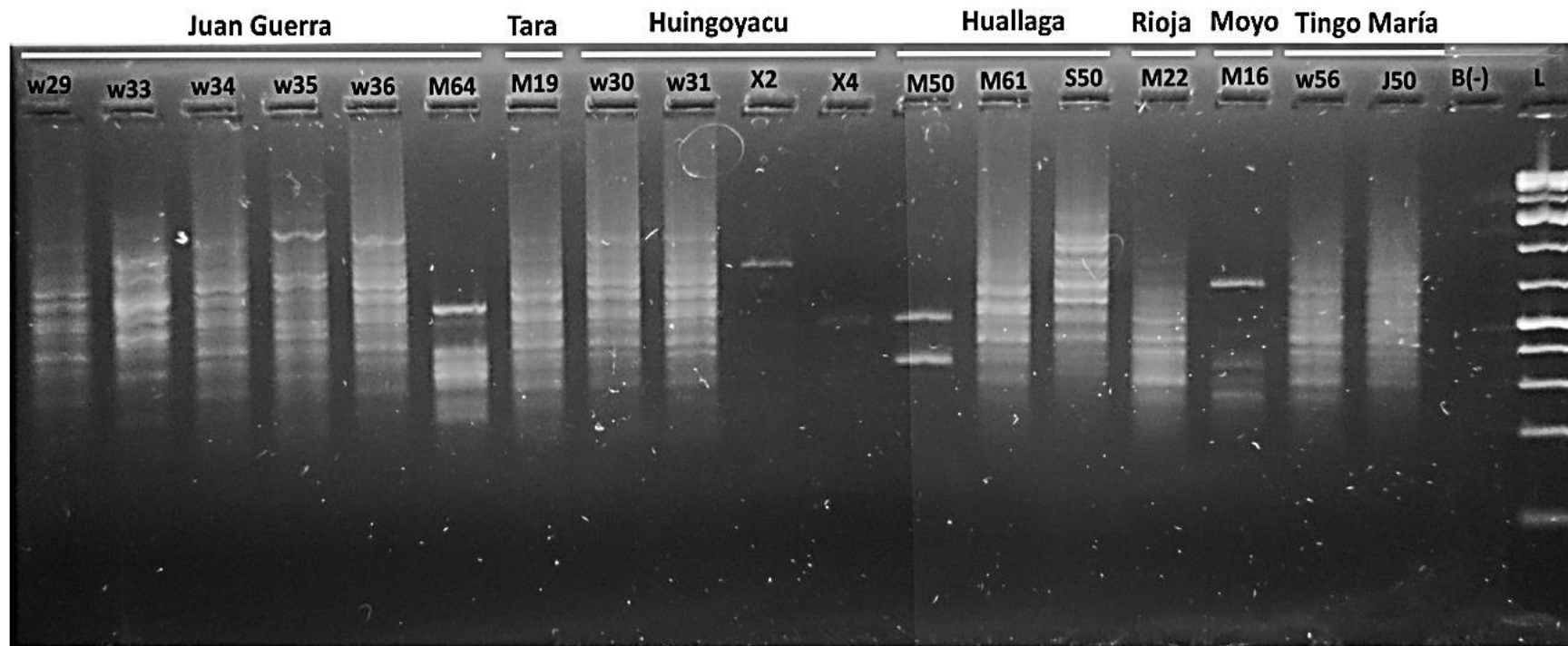
**Figura 30.** Perfiles ISSR de *M. capillaceus* procedentes de seis localidades. Empleando el marcador SAS 1, se encontraron en total 23 posiciones de bandas. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331.



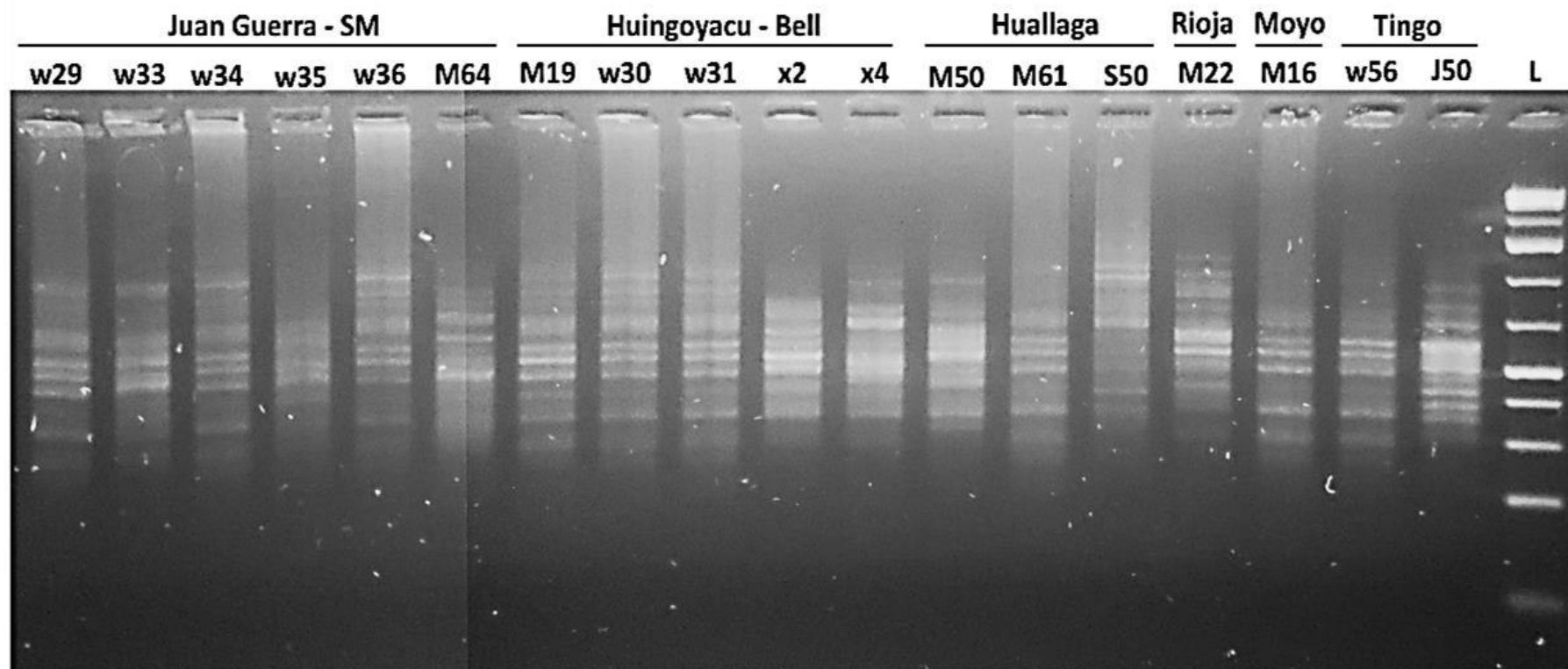
**Figura 31.** Perfiles ISSR de *M. capillaceus* provenientes de siete localidades, empleando el marcador SAS 3. Se encontraron en total 22 posiciones de bandas. Esta fotografía que fue tomada a los 40 minutos de corrida fue la que presentó mejor resolución. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331. Tara: Tarapoto, Moyo: Moyobamba.



**Figura 32.** Perfiles ISSR de *M. capillaceus* provenientes de siete localidades, empleando el marcador UBC 825. Se encontraron en total 18 posiciones de bandas. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331. Tara: Tarapoto, Moyo: Moyobamba.



**Figura 33.** Perfiles de ISSR de *M. capillaceus* precedentes de siete localidades empleando el marcador UBC 811. Se encontraron en total 17 posiciones de bandas. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331. Tara: Tarapoto, Moyo: Moyobamba.



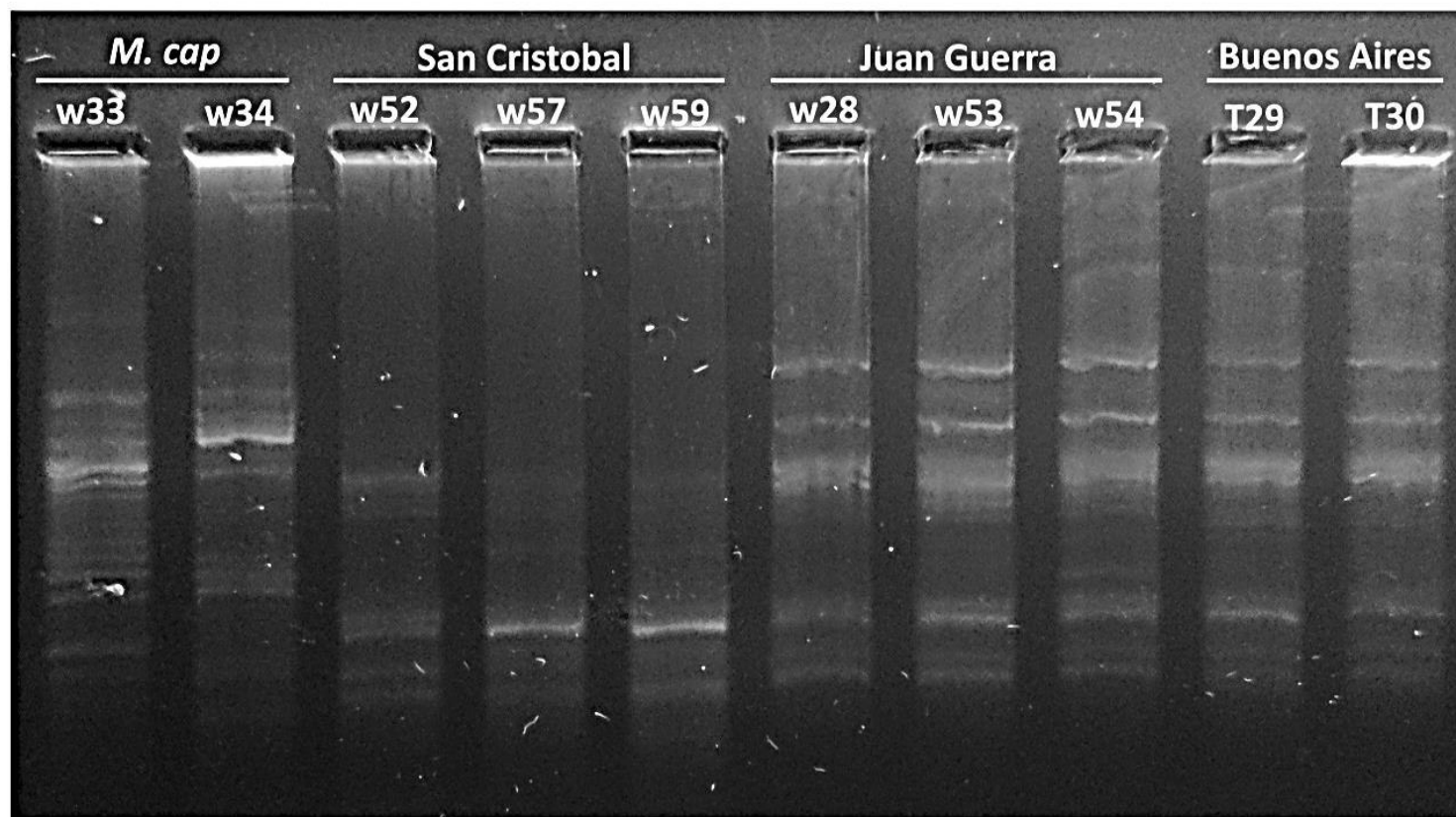
**Figura 34.** Perfiles de ISSR de *M. capillaceus* provenientes de siete localidades empleando el marcador UBC 840. Se encontraron en total 15 posiciones de bandas. Marcador de tamaño molecular (L) Thermo Scientific #SM1331. Moyo: Moyobamba, Tingo: Tingo María.

#### **6.4. Perfiles ISSR en poblaciones de la especie *M. popelairianus sensu lato***

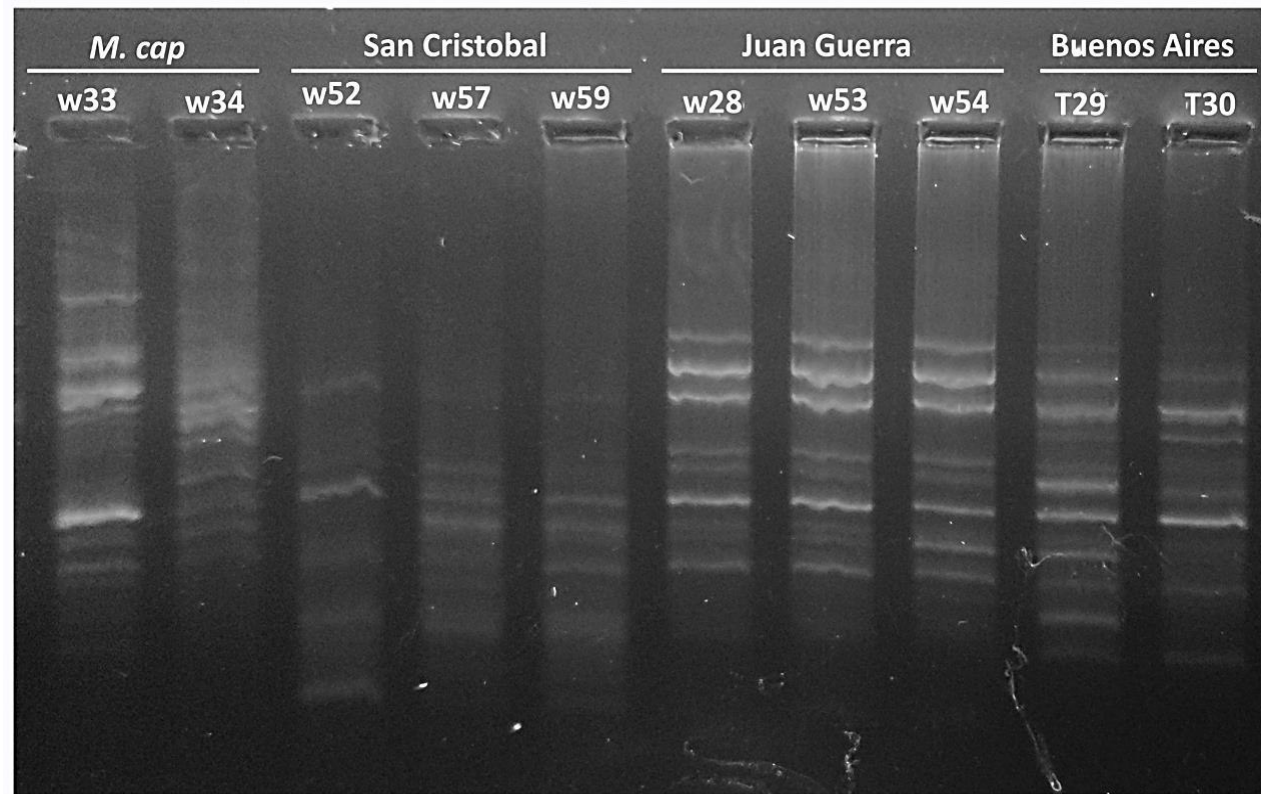
Se obtuvieron en total 87 bandas, siendo SAS 3 el marcador que produjo más posiciones de bandas con 18 sitios en total. (Figuras 35 - 40).

Inicialmente los perfiles electroforéticos obtenidos por amplificación con ISSR mostraron que los individuos rotulados *a priori* como *M. popelairianus* (procedentes de Juan Guerra) mostraron una alta similaridad con la otra población de individuos rotulados también como *M. popelairianus* (procedentes de Buenos Aires) para las poblaciones que pertenecían a *M. popelairianus*, sin embargo lo resaltante en este estudio es que estos patrones a su vez, mostraban un perfil compartido entre los individuos procedentes de Tingo María (región Huánuco) (este último considerado *a priori* como '*M. thammianus*') mostrando el mismo patrón entre ellos claramente discriminante del perfil obtenido a partir de individuos procedentes de San Cristóbal de Puerto Rico (región San Martín), que resultó diferente a los demás con todos los cebadores analizados.



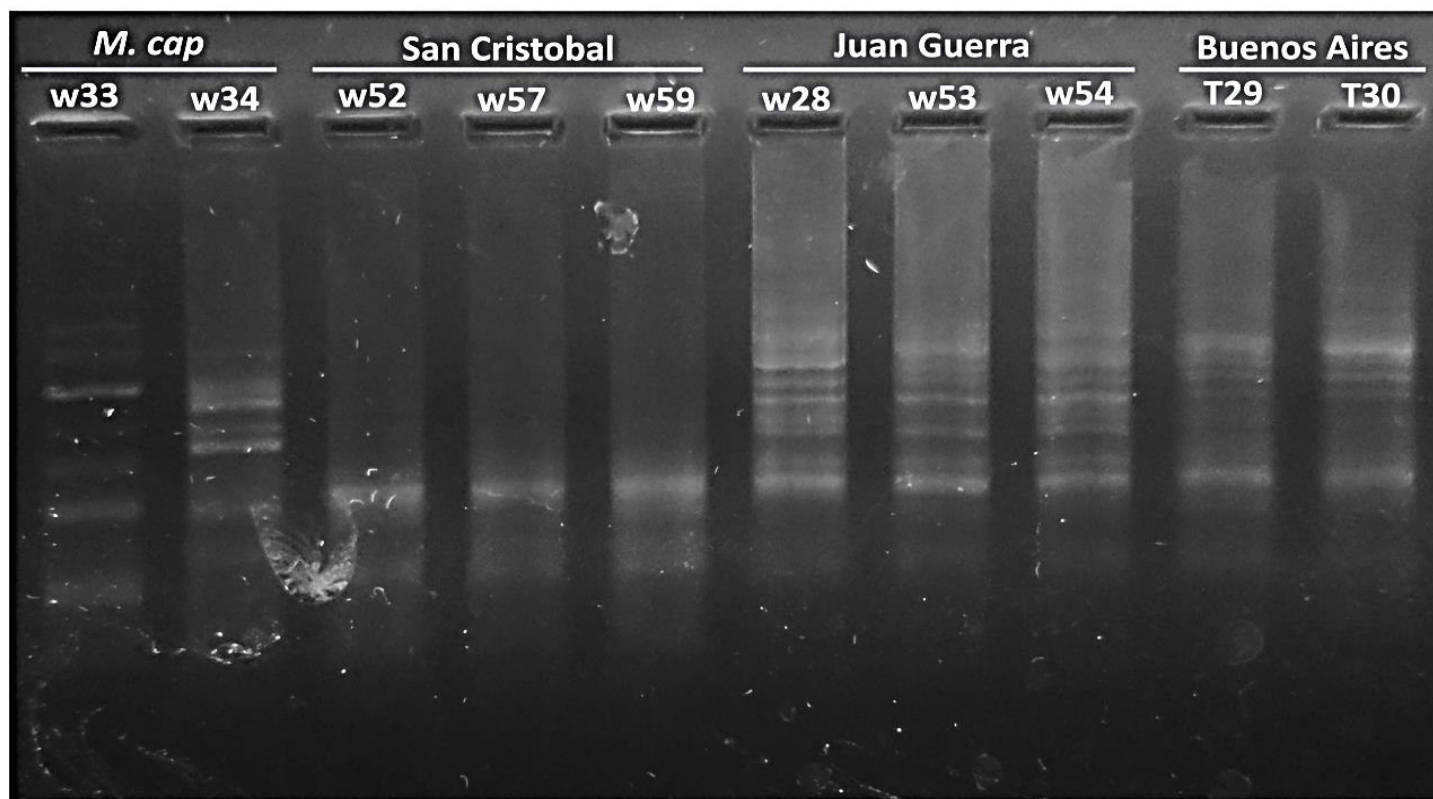


**Figura 35.** Perfiles de ISSR de *M. popelairianus* procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador SAS 1, se encontraron en total 13 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de *M. capillaceus* como referencia.

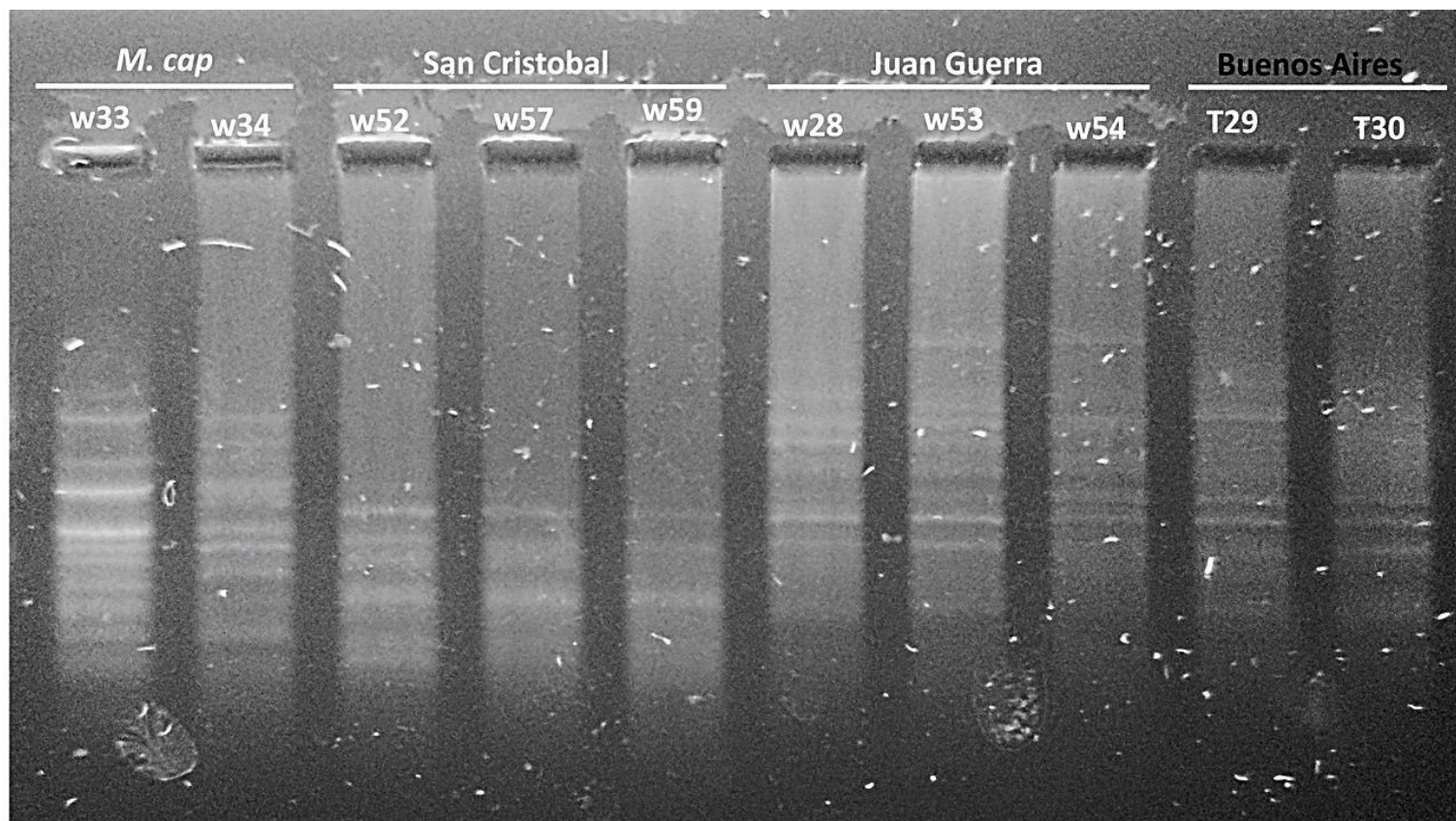


**Figura 36.** Perfiles de ISSR de *M. popelairianus* procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador SAS 3, se encontraron en total 13 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de *M. capillaceus* como referencia.

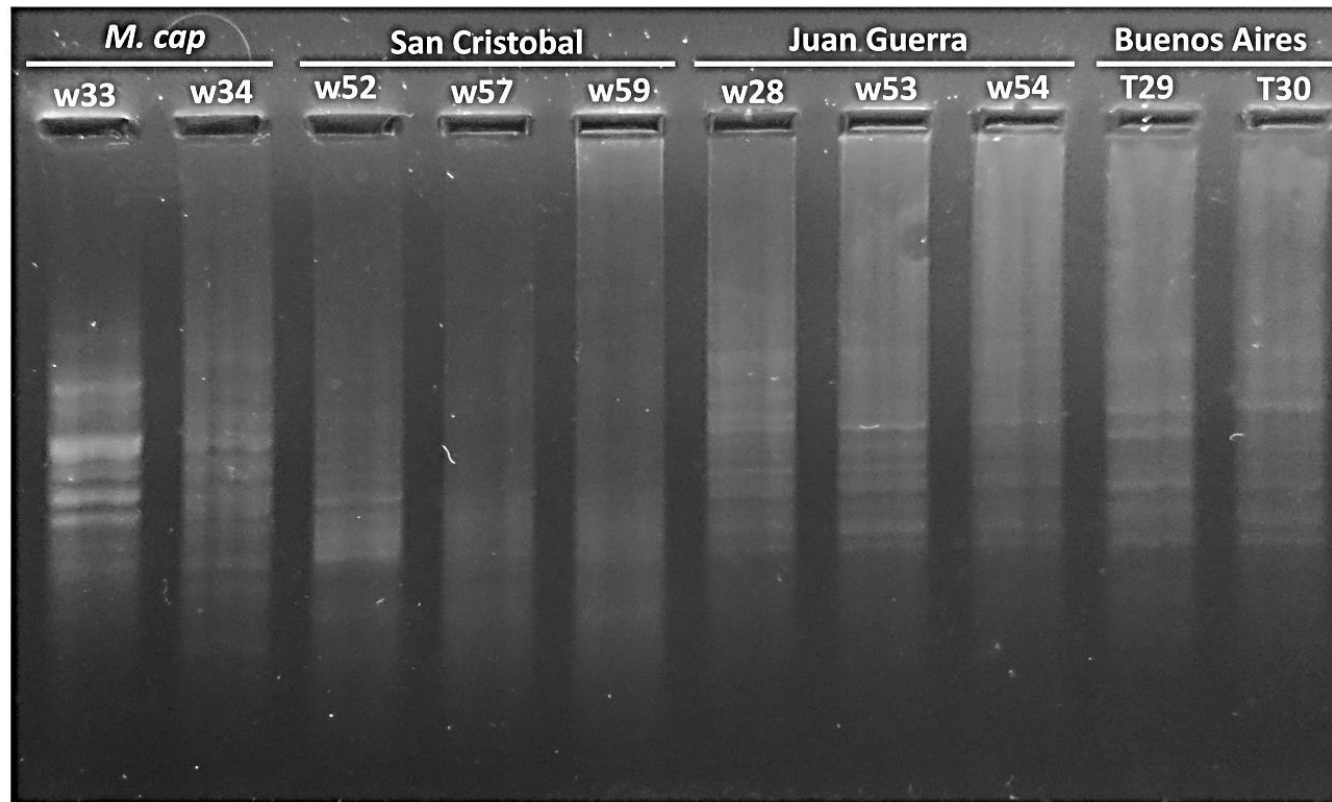




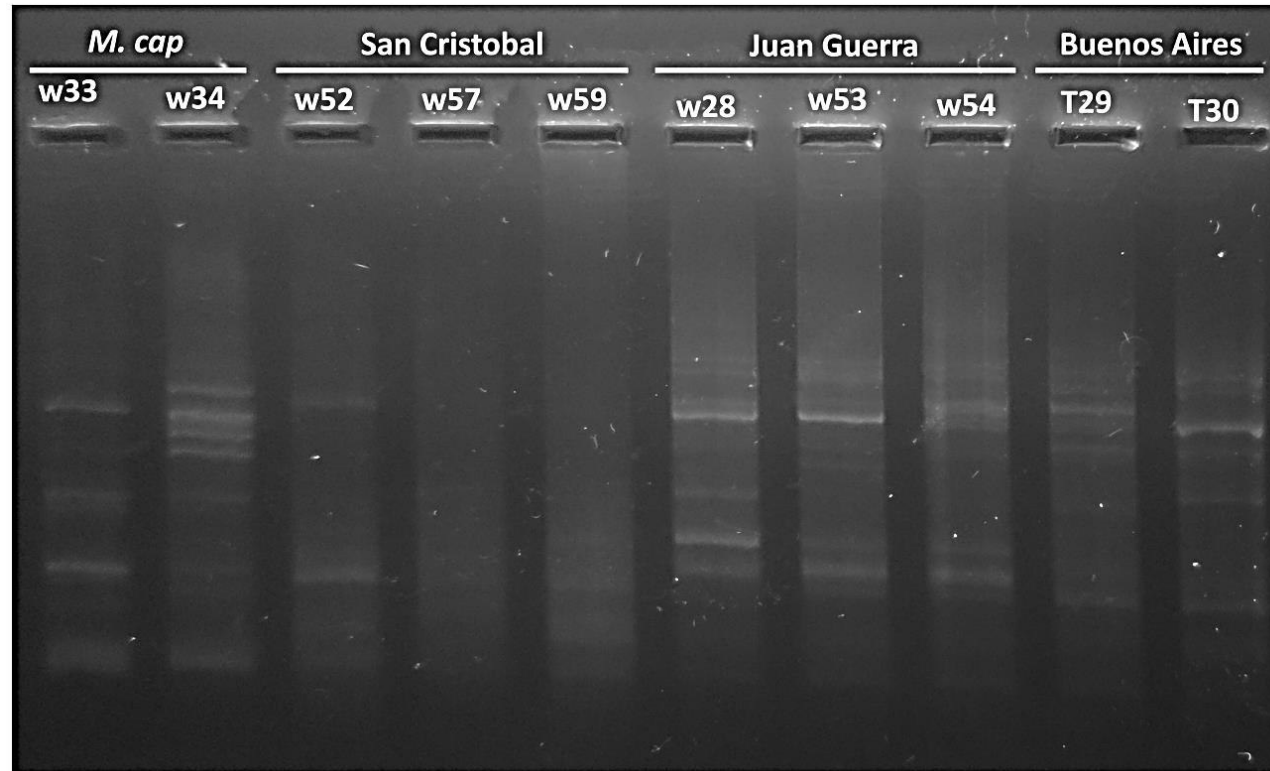
**Figura 37.** Perfiles de ISSR de *M. popelairianus* procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 823, se encontraron en total 11 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de *M. capillaceus* como referencia.



**Figura 38.** Perfiles de ISSR de *M. popelairianus* procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 825, se encontraron en total 12 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de *M. capillaceus* como referencia.



**Figura 39.** Perfiles de ISSR de *M. popelairianus* procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 811, se encontraron en total 10 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de *M. capillaceus* como referencia.



**Figura 40.** Perfiles de ISSR de *M. popelairianus* procedentes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra, Buenos Aires) obtenidos a partir del marcador UBC 840, se encontraron en total 13 posiciones de bandas. Se incluyen dos perfiles de *M. capillaceus* como referencia.

## 6.5. Análisis de distancias genéticas entre especies de *Megalobulimus*

### 6.5.1. Elaboración de matrices de datos y evaluación de sitios informativos

La matriz de datos binaria construida para todas las especies en estudio, resume la información de cada cebador ISSR utilizado, donde cada posición de banda fue considerada como un loci. Se obtuvieron 166 sitios en total, de los cuales el marcador SAS 1 mostró la mayor cantidad de sitios polimórficos (37 posiciones de bandas). El cebador que mostró mayor contenido de información resultó SAS3 con 0.45 de valor PIC, sin embargo, el marcador que tuvo el mayor poder de resolución fue SAS1 con 23.1 Rp (Tabla 11).

**Tabla 11.** Datos de los ISSR de las 6 especies analizadas de *Megalobulimus*. Cálculos hechos en Excel. Los valores más altos se encuentran resaltados en negrita.

	N° total bandas	N° de bandas polimórficas	% bandas polimórficas	PIC	Rp
<b>SAS1</b>	<b>37</b>	37	100	0.429	<b>23.1</b>
<b>SAS3</b>	24	23	95.8	<b>0.455</b>	16.8
<b>UBC 823</b>	30	30	100	0.398	16.4
<b>UBC 825</b>	32	32	100	0.421	19.3
<b>UBC 811</b>	20	20	100	0.364	9.6
<b>UBC 840</b>	23	23	100	0.416	13.6
<b>TOTAL</b>	166	165	-	-	-

PIC: Contenido de Información Polimórfica, Rp: Poder de resolución

La especie que mostró el mayor número de bandas fue *M. capillaceus* (74), seguido de *M. florezi* (65). Además, *M. capillaceus* también fue la que presentó mayor número de bandas únicas junto con *M. lichtensteini* (16) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Patrones de bandas totales para cada especie de *Megalobulimus*.

<b>Especies</b>	<b>M. cap</b>	<b>M. flo</b>	<b>M. pop</b>	<b>M. tham</b>	<b>M. carri</b>	<b>M. lich</b>
Nº Bandas	74	65	55	48	44	49
Nº Bandas únicas	16	12	3	5	14	16
Nº. Band ≤50% (f.≥5%)	45	43	37	27	23	22

No. Bandas = Número de diferentes bandas en total, No. Bandas únicas = No. de bandas únicas para una sola población, No. Bandas ≤ 50% = No. de bandas localmente comunes (frecuencia ≥ 5%) encontradas en menos del 50% de las poblaciones. M. cap = *M. capillaceus*, M. flo = *M. florezi*, M. pop = *M. popelairianus*, M. tham = '*M. thammianus*', M. carri = *M. carrikeri*, M. lich = *M. lichteinteni*.

De la misma manera se ha evidenciado (Tabla 13) que *M. capillaceus* y *M. florezi* poseen el mayor porcentaje de sitios variables con 17.5% y 18.7% respectivamente. Por el contrario, *M. carrikeri* y *M. lichtensteini* mostraron los niveles de variación más pequeños (cerca de 0%).

**Tabla 13.** Análisis de los sitios polimórficos en las poblaciones de *Megalobulimus*, 166 sitios en total. Análisis realizados en DNAsp.

	Tamaño de muestra	%Sitios variables	Diversidad haplotípica	Varianza de la DH
<i>M. capillaceus</i>	3	17.5%	1	0.07
<i>M. florezi</i>	3	<b>18.7%</b>	1	0.07
<i>M. popelairianus</i>	3	10.8%	1	0.07
' <i>M. thammianus</i> '	2	2.4%	1	0.25
<i>M. carrikeri</i>	2	0%	0	0
<i>M. lichtensteini</i>	2	0.6%	1	0.25

Se analizó la diversidad genética de Nei, mostrando que *M. capillaceus* presenta los valores más altos en comparación con las otras especies del género. '*M. thammianus*' fue la especie que presentó mayor porcentaje de polimorfismo (22.9 %) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Diversidad genética en seis especies de *Megalobulimus*, obtenida mediante el software GenAlEx 6.5.

Especie	N	I	He	%P
<i>M. capillaceus</i>	3	0.123 (0.020)	<b>0.086</b> (0.014)	19.28%
<i>M. florezi</i>	3	0.119 (0.019)	0.083 (0.013)	18.67%
' <i>M. thammianus</i> '	5	<b>0.143</b> (0.021)	0.100 (0.015)	<b>22.29%</b>
<i>M. carrikeri</i>	2	0.000	0.000	0.00%
<i>M. lichtensteini</i>	2	0.004 (0.004)	0.003 (0.003)	0.60%

N= número de ejemplares, I = Índice de información de Shannon, He = Diversidad de Nei. %P = porcentaje de loci polimórfico.

### 6.7.2 Distancias genéticas en *Megalobulimus*

Las distancias intraespecíficas promedio reflejaron que *M. capillaceus* presenta una distancia intraespecífica (0.141) ligeramente mayor que *M. florezi* (0.125), en el caso de *M. carrikeri* y *M. lichtensteini* presentaron datos no comparables debido a que para este análisis solo se empleó dos secuencias de cada uno. Sin embargo, una observación resaltante en esta tabla corresponde a la distancia intraespecífica de los individuos considerados *a priori* como '*M. thammianus*' (0.167) es casi la misma que la distancia interespecífica al incluir la otra especie, es decir la evaluación en conjunto con el otro grupo supuestamente *M. popelairianus* (0.156), datos que responden al caso de tratarse de la misma especie y solo se estuviera aumentando el número de muestra, esto por presentar solo una ligera diferencia entre ellas (Tabla 15).

**Tabla 15.** Distancias intraespecíficas promedio de *Megalobulimus* spp.

	<b><i>d</i></b>	<b><i>D.S.</i></b>
<i>M. capillaceus</i>	0.141	0.022
<i>M. florezi</i>	0.125	0.020
<i>M. popelairianus</i>	0.073	0.016
' <i>M. thammianus</i> '	<b>0.167</b>	<b>0.076</b>
<i>M. carrikeri</i>	0.007	-
<i>M. lichtensteini</i>	0.006	-
<i>M. pop</i> + <i>M. tha</i>	<b>0.156</b>	<b>0.029</b>
<i>M. cap</i> + <i>M. flo</i>	0.251	0.020

D.S.= desviación estándar



En cuanto al análisis para la discriminación de especies, se evidencia que en todos los casos la distancia máxima que se puede encontrar dentro de una especie es menor que la distancia con la especie más cercana (siguiente especie). Aquí también se evidencia algo interesante ya que nuestros grupos asignados *a priori* como *M. popelairianus* y *M. thammianus* no se comportan como dos especies independientes como muestra la tabla 15, ya que la máxima distancia intraespecífica de *M. thammianus* corresponde a 16.7 % y la distancia con la especie más cercana que vendría a ser *M. popelairianus* (es decir interespecífica) corresponde a 19.6% (Tabla 16).

**Tabla 16.** Análisis de distancias entre especies. Cálculos hechos con Mega7

	Máxima distancia intraespecífica	Distancia con la especie más cercana	Especie más cercana
<i>M. capillaceus</i>	16.9%	33%	<i>M. florezi</i>
<i>M. florezi</i>	15.8%	33%	<i>M. capillaceus</i>
<i>M. popelairianus</i>	9.7%	<b>19.6%</b>	' <i>M. thammianus</i> '
' <i>M. thammianus</i> '	<b>16.7%</b>	<b>19.6%</b>	<i>M. popelairianus</i>
<i>M. carrikeri</i>	0.6%	37.1%	' <i>M. thammianus</i> '
<i>M. lichtensteini</i>	0.6%	35.1%	<i>M. carrikeri</i>
<i>M. pop+tha</i>	15.6%	37.7%	<i>M. lichtensteini</i>
<i>M. cap+flo</i>	25.1%	46.2%	<i>M. pop + tha</i>

*M. pop+tha* = *M. popelairianus sensu lato*.

Los niveles de  $F_{st}$  encontrados en todas las especies estudiadas están por encima de 0.25 lo que indicarían niveles muy altos de diferenciación genética (Tabla 17).

**Tabla 17.** Diferenciación genética entre especies de *Megalobulimus* mediante estadísticos G<sub>st</sub> y F<sub>st</sub>.

Población 1	Población 2	G <sub>st</sub>	F <sub>st</sub>
<b><i>M. capillaceus</i></b>	<i>M. florezi</i>	0	0.26
<b><i>M. capillaceus</i></b>	<i>M. popelairianus</i>	0	0.53
<b><i>M. capillaceus</i></b>	' <i>M. thammianus</i> '	0.008	0.48
<b><i>M. capillaceus</i></b>	<i>M. carrikeri</i>	0.29	0.67
<b><i>M. capillaceus</i></b>	<i>M. lichtensteini</i>	0.008	0.65
<b><i>M. florezi</i></b>	<i>M. popelairianus</i>	0	0.68
<b><i>M. florezi</i></b>	' <i>M. thammianus</i> '	0.008	0.59
<b><i>M. florezi</i></b>	<i>M. carrikeri</i>	0.29	0.70
<b><i>M. florezi</i></b>	<i>M. lichtensteini</i>	0.008	0.74
<b><i>M. popelairianus</i></b>	' <i>M. thammianus</i> '	0.008	0.42
<b><i>M. popelairianus</i></b>	<i>M. carrikeri</i>	0.29	0.84
<b><i>M. popelairianus</i></b>	<i>M. lichtensteini</i>	0.008	0.61
<b>'<i>M. thammianus</i>'</b>	<i>M. carrikeri</i>	0.33	0.75
<b>'<i>M. thammianus</i>'</b>	<i>M. lichtensteini</i>	0.0	0.76
<b><i>M. carrikeri</i></b>	<i>M. lichtensteini</i>	0.33	0.95

### 6.7.3 Diferenciación entre especies de *Megalobulimus*

Los resultados del agrupamiento entre especies empleando el algoritmo UPGMA mostraron un buen soporte *bootstrap* en el ordenamiento, discriminando claramente a las especies. Los individuos w28 y w53 (*'M. thammianus'*) provenientes de la misma localidad (Juan Guerra), mientras que el individuo r90 (*'M. thammianus'*) proveniente de Moyobamba, forman un grupo bien soportado (89 *bootstrap*), cabe mencionar que estas muestras fueron identificadas *a priori* como *M. popelairianus*; los otros individuos con los que conforma el clado (i66 e i59) que provienen de Tingo María, fueron etiquetados *a priori* como *'M. thammianus'*, sin embargo basado en todos los análisis efectuados todas las especies provenientes de esta localidad serían realmente *'M. thammianus'* (Figura 41).

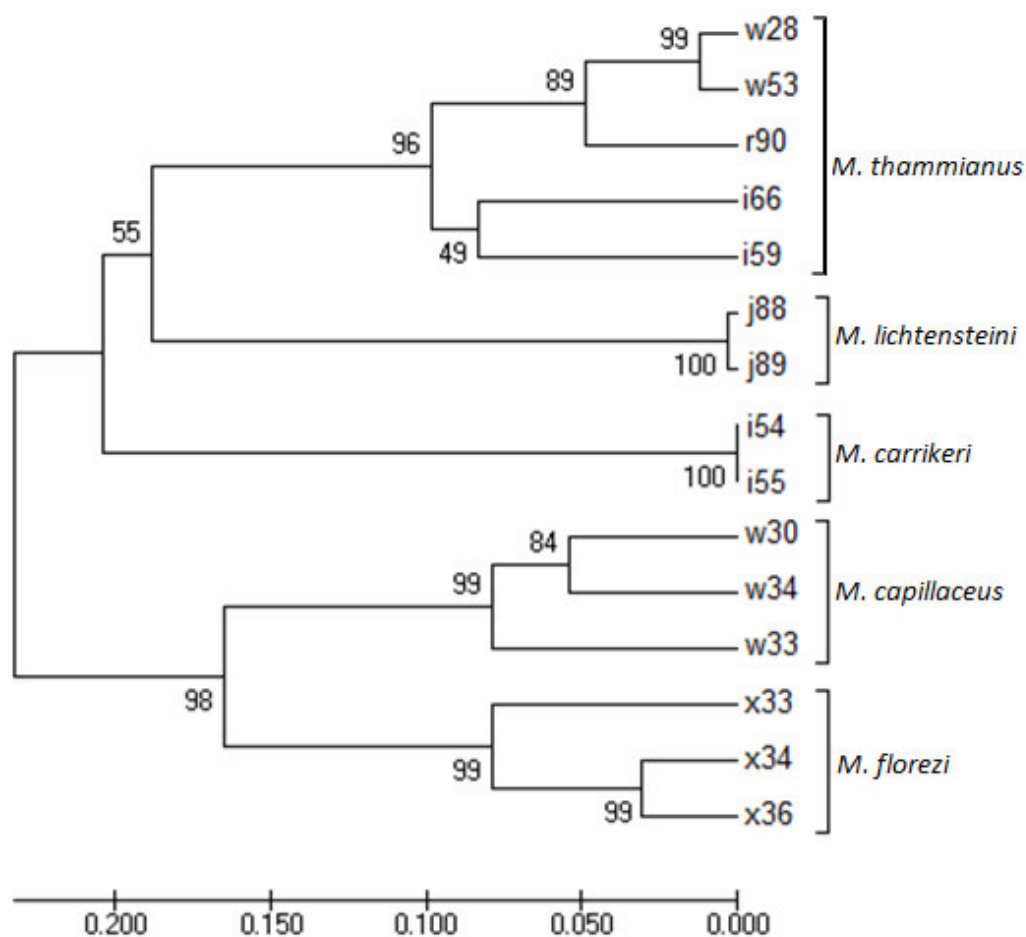
Dada la presunción (basadas en los perfiles electroforéticos) de que la agrupación inicial se encontraba errónea, se volvió a reagrupar a los individuos de manera que las muestras provenientes de Juan Guerra, Buenos Aires y Tingo María quedaron asignadas como *'M. thammianus'*, y solo los individuos procedentes de San Cristóbal serían *M. popelairianus*.

Los análisis de distancias intraespecíficos hechos con esta nueva agrupación se muestran en la tabla 18, esta vez empleando GeneAEx (cabe señalar que todos los resultados obtenidos coinciden con los encontrados en DNAsp y Mega7).

**Tabla 18.** Distancia genética de Nei, evaluada para cinco especies de *Megalobulimus* usando el software GenAlEx 6.5

M. cap	M. flo	M. tham	M. carri	M. lich	
0.000					M. cap
0.316	0.000				M. flo
0.542	0.514	0.000			M. tham
0.617	0.584	0.432	0.000		M. carri
0.629	0.536	0.407	0.639	0.000	M. lich

M. cap: *M. capillaceus*, M. flo: *M. florezi*, M. tham: *M. thammianus*, M. carri: *M. carrikeri*, M. lich: *M. lichtensteini*



**Figura 41.** Agrupamiento de las especies *Megalobulimus* en base al algoritmo UPGMA.

## **6.6. Análisis de diversidad genética y estructura poblacional de *M. capillaceus***

### **6.6.1. Elaboración de matrices de datos y evaluación de sitios informativos**

Se construyó una matriz de datos binaria adjuntando la información de cada cebador ISSR utilizado para cinco poblaciones de *M. capillaceus*, consiguiendo en total 104 loci, donde cada posición de banda se consideró como un loci, para propósitos del estudio.

La población de *M. capillaceus* con mayor número de bandas en total fue Juan Guerra (85), también fue la que presentó más bandas únicas (9). La población que presentó una sola posición de banda para todos los individuos en esa población fue Huingoyacu (Figuras 29 -34; Tabla 19).

De los seis cebadores empleados en este estudio, se obtuvo en promedio 97.76% de sitios polimórficos. El cebador con mayor número de bandas para las poblaciones de *M. capillaceus* fue SAS1 con 22 bandas. Los cebadores con mayor contenido de información fueron UBC 825 y UBC 811, con un poder de resolución de 18 y 17.9 respectivamente (Tabla 19 y 20 muestran el número de bandas por marcador y localidad en ese orden).

**Tabla 19.** Datos observados respecto a las bandas generadas por los cebadores ISSR. Los valores en negrita señalan los valores más altos.

	N° de Bandas	N° de sitios polimórficos	% Sitios polimórficos	PIC	Rp
<b>SAS1</b>	21	21	100	0.44	14.0
<b>SAS3</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	100	0.45	14.9
<b>UBC 823</b>	9	9	100	0.46	6.3
<b>UBC 825</b>	18	18	100	<b>0.50</b>	18
<b>UBC 811</b>	17	17	100	<b>0.50</b>	17.9
<b>UBC 840</b>	15	13	86.6	0.49	16.9
<b>Total</b>	102	100	98.04	-	-

Contenido de Información Polimórfica (PIC), Rp: Poder de resolución (Rp).

**Tabla 20.** Patrones de bandas totales para cada población de *M. capillaceus*.

Población	Juan Guerra	Huingo-yacu	Rioja-Moyoba	Huallaga	Tingo María
No. Bandas totales	85	63	45	66	40
No. Bandas Únicas	9	1	3	6	2
No. Bandas $\leq 50\%$ (f. $\geq 5\%$ )	22	12	6	11	5

No. Bandas únicas = No. de bandas únicas para una sola población, No. Bandas  $\leq 50\%$  = No. de bandas localmente comunes (frecuencia  $\geq 5\%$ ) encontradas en menos del 50% de las poblaciones.

El índice de diversidad de Nei (He) y el índice de diversidad de Shannon (I) fueron, en promedio, 0.191 y 0.273 respectivamente, y se observaron valores altos para las poblaciones de Juan Guerra y Huallaga, los cuales son correspondientes con el alto porcentaje de polimorfismo de las bandas (Tabla 21).

**Tabla 21.** Diversidad genética de *M. capillaceus*, obtenida mediante el software GenAlEx 6.5.

Población	n	I	He	%P
Juan Guerra	7	0.413 (0.026)	0.277 (0.018)	75.00
Huingoyacu	4	0.331 (0.033)	0.236 (0.024)	50.00
Rioja-Moyoba	2	0.240 (0.032)	0.173 (0.023)	34.62
Huallaga	3	0.355 (0.031)	0.248 (0.022)	55.77
Tingo María	2	0.027 (0.013)	0.019 (0.009)	3.85
Media		0.273 (0.014)	0.191 (0.01)	43.85

n = tamaño de la muestra, I = Índice de información de Shannon, He = Diversidad de Nei, %P = porcentaje de loci polimórfico.

#### 6.6.2. Distancias genéticas entre poblaciones de *Megalobulimus capillaceus*

Se halló la identidad genética de Nei basado en las matrices binarias de poblaciones vs loci. La identidad más alta (0.88) fue observada entre las poblaciones de Huingoyacu (Distrito de San Pablo – San Martín) y Juan Guerra (San Martín) y la identidad más baja (0.71) fue entre las poblaciones de Tingo María (Prov. Leoncio Prado) y Huingoyacu (Tabla 22).

**Tabla 22.** Identidad genética de Nei, generada para cinco poblaciones de *M. capillaceus*, usando el software GenAlEx 6.5.

	<b>Juan Guerra</b>	<b>Huingoyacu</b>	<b>Rioja- Moyobamba</b>	<b>Huallaga</b>	<b>Tingo María</b>
<b>Juan Guerra</b>	1.000				
<b>Huingoyacu</b>	0.880	1.000			
<b>Rioja-Moyob</b>	0.753	0.819	1.000		
<b>Huallaga</b>	0.799	0.839	0.813	1.000	
<b>Tingo María</b>	0.736	0.713	0.742	0.784	1.000

La construcción de una matriz de distancias genéticas de Nei, para las poblaciones de *M. capillaceus*, mostró el valor más alto de 0.338 para las poblaciones de Tingo María vs Huingoyacu, y el valor más bajo de 0.127 para las poblaciones de San Pablo y San Martín (Tabla 23).

**Tabla 23.** Distancia genética de Nei, evaluada para cinco poblaciones de *M. capillaceus* usando el software GenAlEx 6.5

	<b>Juan Guerra</b>	<b>Huingoyacu</b>	<b>Rioja- Moyobamba</b>	<b>Huallaga</b>	<b>Tingo María</b>
<b>Juan Guerra</b>	0.000				
<b>Huingoyacu</b>	0.127	0.000			
<b>Rioja-Moyob</b>	0.283	0.199	0.000		
<b>Huallaga</b>	0.225	0.175	0.207	0.000	
<b>Tingo María</b>	0.307	0.338	0.298	0.244	0.000

La prueba de AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) mostró el mayor porcentaje de variación al analizarse dentro de las poblaciones, lo que indica que no existe estructuración geográfica en *M. capillaceus*. El porcentaje de variación fue del



18% entre las poblaciones, mientras que el 82% se observó dentro de las poblaciones (Tabla 24).

**Tabla 24.** Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las accesiones de *M. capillaceus*.

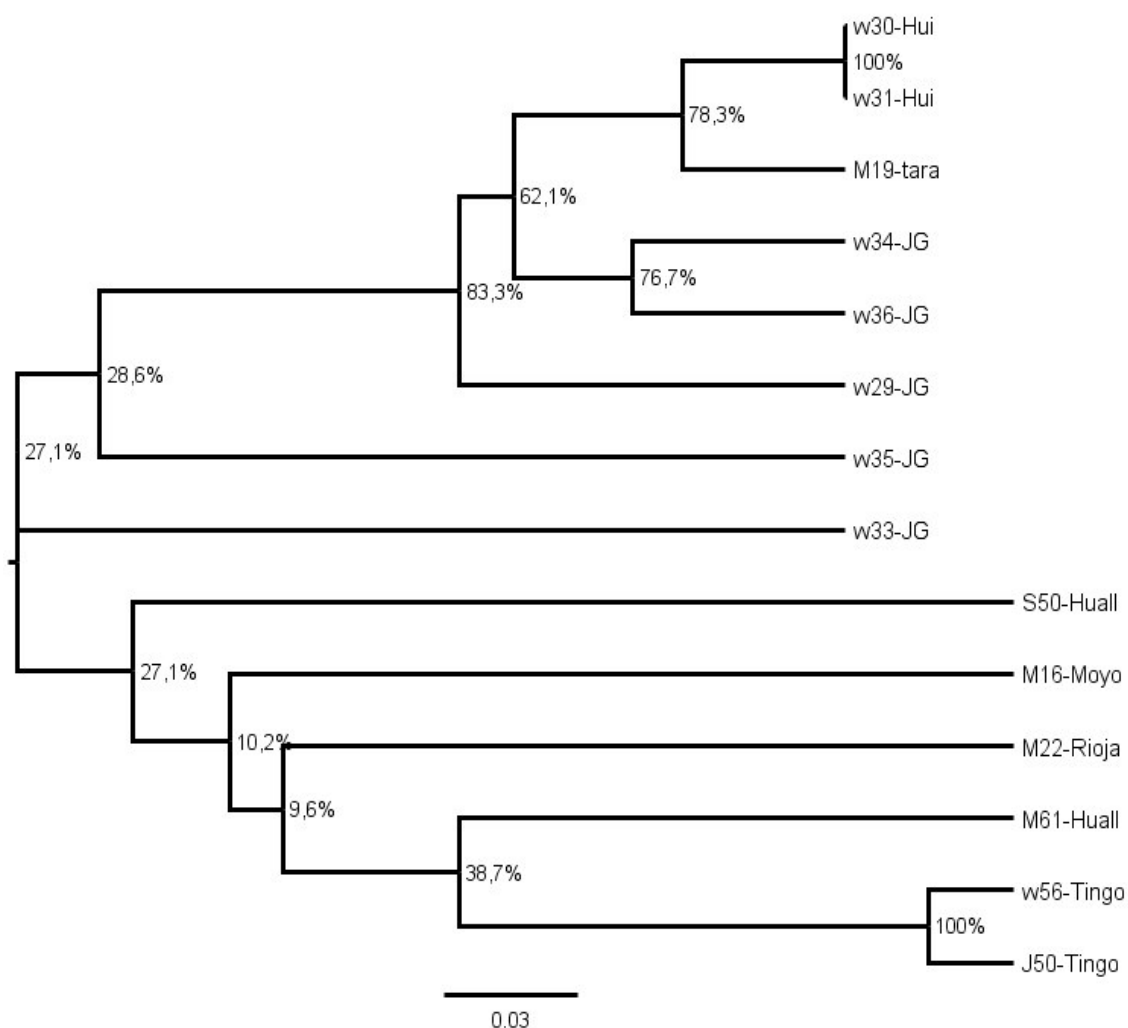
	df	SS	MS	Est. Var.	% variación
<b>Entre Pobl.</b>	4	111.032	27.758	3.486	18%
<b>Dentro Pobl.</b>	13	208.524	16.040	16.040	82%
<b>Total</b>	17	319.556		19.527	100%
<b>PhiPT</b>	0.179	P (rand > data) = 0.029			

SS: suma de cuadrados, MS: cuadrados medios, Est. var.: variabilidad estimada; % de la proporción de la variabilidad genética, p nivel de significación

### 6.6.3. Diferenciación poblacional de *M. capillaceus*

Se realizó un agrupamiento de las poblaciones de *M. capillaceus* mediante el método UPGMA basado en las distancias encontradas entre ellas, a partir del patrón de bandas reflejado en las matrices. En la figura 42 se muestra un agrupamiento con alto soporte (100%) de los individuos de Tingo María, los más alejados geográficamente del resto, y ubicadas fuera del departamento de San Martín. Además, se muestra un buen soporte (83%) en el clado que agrupa a la mayoría de secuencias de Juan Guerra con las de Tarapoto y Huingoyacu, siendo estas tres de las localidades del sur de San Martín, dejando fuera a la localidad del Huallaga. Fuera de este clado también quedan las secuencias de las localidades del norte de San Martín (Rioja y Moyobamba), pero todas con muy bajo soporte de *Bootstrap* lo que es lo mismo que todos estos nodos estén colapsados, sin indicar mayor estructuración geográfica, (coincidiendo con los resultados de AMOVA) de esta manera se muestra una correspondencia entre

las agrupaciones encontradas mediante distancia de las matrices ISSR y las distancias geográficas.



**Figura 42.** Dendrograma muestra el agrupamiento de las poblaciones de *M. capillaceus*, obtenido mediante el método UPGMA en el software Mega7.

## 6.7. Análisis de diversidad genética en *M. popelairianus sensu lato*

### 6.7.1. Elaboración de matrices de datos y evaluación de sitios

#### informativos

La matriz binaria con los datos de *M. popelairianus* reunió la información obtenida de individuos provenientes de tres localidades (San Cristóbal, Juan Guerra y Buenos Aires) inicialmente denominados como *M. popelairianus*, a la cual se adicionó la información de los individuos provenientes de dos localidades (Tingo María y Moyobamba) inicialmente denominados como *M. thammianus*. Debido a la dificultad en la identificación, se optó por realizar los análisis en conjunto como un solo grupo denominado *M. popelairianus sensu lato*.

Se obtuvo en promedio 53.85% de sitios polimórficos. Todos los cebadores mostraron una cantidad similar de bandas en los perfiles de ISSR (entre 10 y 13 bandas). Los cebadores con mayor contenido de información fueron UBC 825 y UBC 823, con un poder de resolución de 13.75 y 12.25 respectivamente (Tabla 25).

**Tabla 25.** Datos de los ISSR de 11 individuos analizados de *M. popelairianus sensu lato*. Cálculos hechos en Excel. Los valores más altos se encuentran resaltados en negrita.

	N° de Bandas	N° de sitios polimórficos	% Sitios polimórficos	PIC	Rp
<b>SAS1</b>	13	7	53.85	0.39	19
<b>SAS3</b>	13	5	38.46	0.34	<b>20.25</b>
<b>UBC 823</b>	11	9	81.82	<b>0.49</b>	12.25
<b>UBC 825</b>	12	9	75.00	<b>0.49</b>	13.75
<b>UBC 811</b>	10	7	70.00	0.48	12.14
<b>UBC 840</b>	13	11	<b>84.62</b>	0.46	16.5
<b>Total</b>	72	48	66.67	-	-

PIC: Contenido de Información Polimórfica, Rp: Poder de resolución.

La población con mayor número de bandas fue Juan Guerra (64), también fue la que presentó más bandas únicas (10). Ninguna población presentó bandas comunes entre todas las poblaciones que esté presente en menos del 50% de las poblaciones en una frecuencia mayor o igual al 5% (Tabla 26).

**Tabla 26.** Patrones de bandas totales para cada población de *M. popelairianus*

<b>Población</b>	<b>San Cristóbal</b>	<b>Juan Guerra</b>	<b>Buenos Aires</b>	<b>Huánuco* Tingo Mar</b>
<b>N° Bandas</b>	31	64	53	52
<b>N° Bandas Únicas</b>	5	10	5	12
<b>N° Bandas ≤50% (f. ≥5%)</b>	2	12	7	5

No. Bandas = Número de diferentes bandas, No. Bandas únicas = No. de bandas únicas para una sola población, No. Bandas ≤ 50% = No. de bandas localmente comunes (frecuencia ≥ 5%) encontradas en menos del 50% de las poblaciones.

\*Huánuco: Se considera parte de esta población al individuo colectado en Moyobamba.

Respecto a la diversidad genética encontrada en cada población, se observa que la población de Huánuco mostró el mayor nivel de polimorfismo (19.54 %), seguido de San Cristóbal (8.05%). El índice de diversidad de Nei (He) y el índice de diversidad de Shannon (I) fueron, en promedio, 0.039 y 0.055 respectivamente, el valor más alto de I, lo obtuvo la población de Huánuco, (Tabla 27).

**Tabla 27.** Diversidad genética en los individuos de *M. popelairianus sensu lato*

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>He</b>	<b>%P</b>
<b>San Cristóbal</b>	3	0.022 (0.013)	0.015 (0.009)	3.45%
<b>Juan Guerra</b>	3	0.051 (0.019)	0.036 (0.013)	8.05%
<b>Buenos Aires</b>	2	0.024 (0.014)	0.017 (0.01)	3.45%
<b>Huánuco</b>	3	0.124 (0.027)	0.087 (0.019)	19.54%
<b>Media</b>	-	0.055	0.039	8.62%

N= número de ejemplares, Ne = No. de alelos efectivos, I = Índice de información de Shannon, He = Diversidad de Nei. %P = porcentaje de loci polimórfico.

#### **6.7.2. Distancias genéticas en *Megalobulimus popelairianus sensu lato***

Se realizó un análisis de la identidad genética mediante el estadístico de Nei, de las poblaciones asignadas inicialmente como *M. popelairianus* y '*M. thammianus*', provenientes de 4 localidades, entre todas, el par de localidades que mostró mayor identidad entre ellas fueron Buenos Aires y Juan Guerra (0.76), y la menos idéntica a las demás resultó ser San Cristóbal de Puerto Rico, que se muestra en la Tabla 28.

**Tabla 28.** Identidad genética de Nei, generada para 4 poblaciones de *M. popelairianus s. l.*, usando el software GenAlEx 6.5.

	San Cristóbal	Juan Guerra	Buenos Aires	Huánuco
San Cristóbal	1.000			
Juan Guerra	0.535	1.000		
Buenos Aires	0.567	0.758	1.000	
Huánuco	0.505	0.615	0.637	1.000

La construcción de una matriz de distancias genéticas de Nei, para las poblaciones de *M. popelairianus s.l.*, mostró que los individuos provenientes de San Cristóbal de Puerto Rico mostraban claramente mayor distancia genética en relación con las otras poblaciones de Buenos Aires, Juan Guerra e inclusive Huánuco (Moyobamba y Tingo María) San Cristóbal y Juan Guerra (Tabla 29).

**Tabla 29.** Distancia genética de Nei, evaluada para 4 poblaciones de *M. popelairianus s.l.* usando el software GenAlEx 6.5

	San Cristóbal	Juan Guerra	Buenos Aires	Huánuco
San Cristóbal	0.000			
Juan Guerra	0.626	0.000		
Buenos Aires	0.568	0.278	0.000	
Huánuco	<b>0.683</b>	0.486	0.451	0.000

A pesar de que las tres poblaciones asignadas inicialmente como *M. popelairianus* analizadas se encuentran cercanas geográficamente, la prueba de AMOVA (Excoffier et al., 1992) arrojó un porcentaje de variación del 85% entre las poblaciones, mientras que dentro de las poblaciones se observó un 15%

(Tabla 30), lo cual indica que *M. popelairianus sensu lato* tiene una estructuración poblacional, o que contendría dos unidades de diferenciación específica. Además, los resultados basados en distancia (Tabla 31) muestran que la distancia interespecífica encontrada entre estas dos especies es mayor que la encontrada dentro de cada una.

**Tabla 30.** Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las accesiones de *M. popelairianus*.

	DF	SS	MS	VAR. EST.	% VARIACIÓN
<b>Entre poblaciones</b>	3	139.227	46.409	15.995	85%
<b>Dentro de poblaciones</b>	7	19.500	2.786	2.786	15%
<b>Total</b>	10	158.727		18.781	100%
Phipt	0.852	<b>P (rand &gt; data) = 0,001</b>			

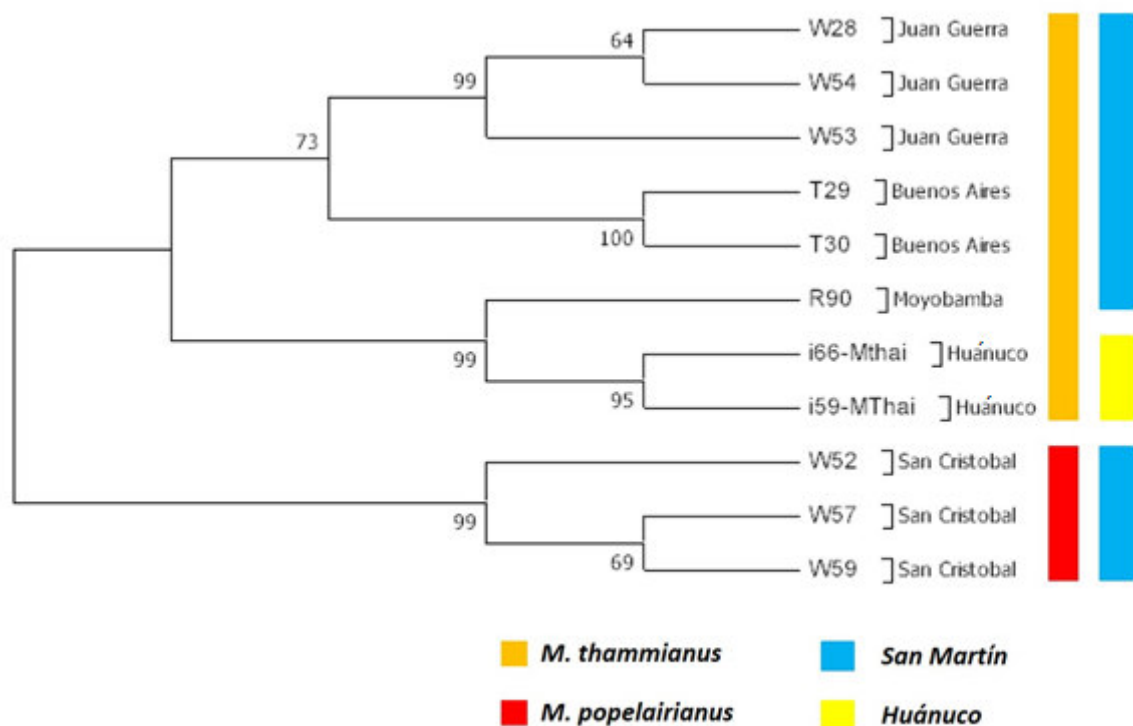
SS: suma de cuadrados, MS: cuadrados medios, Est. var.: variabilidad estimada; % de la proporción de la variabilidad genética, p nivel de significación

**Tabla 31.** Análisis de distancias entre los grupos definidos de *M. popelairianus* s.l. Resultados obtenidos con Mega 7.

	Distancia intraespecífica	Distancia interespecífica
<i>M. popelairianus</i>	2	37.7
<i>'M. thammianus'</i>	20.7	

### 6.7.3. Diferenciación en *M. popelairianus sensu lato*

El agrupamiento por distancias mostrado en la figura 42, refleja con alto soporte (*Bootstrap* 99%) que el grupo formado por los individuos denominados *a priori* como “*M. thammianus*’” provenientes de Huánuco (Tingo María y Moyobamba) se ubica de manera basal a los grupos de Juan Guerra y Buenos aires, presentando así, menor distancia genética con los individuos provenientes de estas dos localidades (denominados *a priori* como “*M. popelairianus*”). En comparación, los de San Cristóbal, que se agrupan con un buen soporte (*Bootstrap* 99%), se encuentran más alejados y forman un grupo basal a todos los demás, confirmando las diferencias obtenidas por los análisis estadísticos anteriores.



**Figura 43.** Relaciones entre las poblaciones de *M. popelairianus sensu lato*, usando el algoritmo UPGMA (1000 *Bootstrap*) implementado en Mega 7.



Al separar ambos grupos de individuos en sus respectivos taxa, se observa que la variación dentro de las especies asignadas (distancia intraespecífica) es menor con lo encontrado entre ellas (distancia con la siguiente especie). Dentro del taxa '*M. thammianus*' se diferenciaron dos grupos, donde se observa una mayor variación a nivel intraespecífico de los individuos provenientes de la provincia de San Martín (Tabla 32).

**Tabla 32.** Análisis de distancias entre *M. popelairianus* y las poblaciones de '*M. thammianus*'. Resultados obtenidos con Mega 7.

	Distancia con la siguiente especie	Max distancia Intraespecífica	Siguiente especie
<b><i>M. popelairianus</i></b>	<b>44.6%</b>	<b>3%</b>	<b><i>M. tham</i> Huánuco</b>
<b><i>M. tham</i> San Martín</b>	<b>35%</b>	<b>25%</b>	<b><i>M. tham</i> Huánuco</b>
<b><i>M. tham</i> Huánuco</b>	<b>35%</b>	<b>16%</b>	<b><i>M. tham</i> San Martín</b>

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. ISSR como evidencia molecular de las variaciones morfológicas

La morfología de los moluscos involucra caracteres conchológicos que están bajo la influencia del ambiente, y el problema más importante en la taxonomía de Megalobuliminae es la plasticidad de sus caracteres anatómicos; en el género *Megalobulimus* ocurre que su anatomía interna es bastante similar y homogénea entre las especies (Leme, 1973), lo cual reduce la probabilidades de encontrar características anatómicas que permitan discriminar especies. Sin embargo, algunos caracteres basados en los órganos sexuales de estos moluscos, como lo demostrado por Borda (2014) pueden servir como buenos caracteres diagnóstico ya que proporcionan buena resolución para ayudar a diferenciar especies; por lo cual, no es la intención reemplazar el método molecular por el taxonómico, sino entonces, combinar la información de ambos tipos y complementar la información.

Cada vez más, los estudios están incluyendo ambos tipos de información, para evaluar determinados grupos de caracoles, esto a su vez funciona como retroalimentación ya que nos permite ver si los caracteres morfológicos usados son, en realidad, diagnósticos para un grupo o si han aparecido independientemente en múltiples ocasiones, en forma de homoplasia (Borda, *congresss Neotropical malacologists, Mexico, June 2014*) lo que conlleva a correcciones en la sistemática. Para resaltar este punto podemos mencionar el trabajo de Chueca y colaboradores (2018) en el género *Candidula* donde develaron que muchas de sus especies en realidad corresponderían a otros nuevos géneros pertenecientes a diferentes tribus de su familia (Hygromiidae)

por lo que las estructuras similares en el aparato estimulador del sistema genital en diferentes taxa no reflejaban necesariamente cercanía evolutiva y que a su vez se necesitaría de un estudio que incluyera más géneros para poder entender la evolución de dicho aparato. Otro ejemplo es la reevaluación de la sistemática de la familia Hygromiidae (Neiber *et al.*, 2017), grupo que ha sido clasificado tradicionalmente en la estructura del aparato del dardo, donde al añadir la información molecular se pudo evidenciar que algunas de sus subdivisiones aceptadas eran en realidad polifiléticas.

## **7.2. Análisis de datos con un marcador de naturaleza dominante**

Las frecuencias de cada alelo se infirieron a partir de la frecuencia de los homocigotos "nulos" (las bandas ausentes), asumiendo el HWE. Tal inferencia sería sensible a la estrategia de muestreo y al ciclo de vida del organismo en estudio, ya que cualquier desviación de los supuestos de HWE afectará la precisión de la estimación de las frecuencias de los alelos, así como cualquier parámetro posterior derivado de estas estimaciones.

Podría haber algunos cuestionamientos sobre el uso de marcadores del tipo dominantes, sin embargo, los cladogramas obtenidos que corresponden al agrupamiento entre especies fueron contrastados con estudios previos donde usaron marcadores de secuencia (COI, 16S rRNA), resultando un correcto agrupamiento de las especies en los clados ya detallados (Ramírez *et al.*, 2012), por tal razón se apoya la confiabilidad de la técnica PCR-ISSR, dado que no resultaron ambigüedades e incongruencias en estas especies de *Megalobulimus*.

La cantidad de sitios variables provistos por marcadores de secuencia en análisis de variación interespecífica de *Megalobulimus* pueden tomar valores como 42% en 16S rRNA y 32% en COI (Congrains, 2010). Aunque la cantidad de sitios variables e informativos dentro de algunas especies es muy limitada (Ramírez *et al.* 2012; Congrains, 2010), el marcador 16S rRNA amplifica pocos sitios informativos al comparar la información obtenida en la presente tesis, se ha podido generar 165 sitios informativos en el análisis de *Megalobulimus* que se complementan con los niveles altos de sitios variables dentro de las especies de *M. popelairianus* (48 bandas polimórficas) y *M. capillaceus* (100 bandas polimórficas).

Además, la resolución obtenida mediante marcadores ISSR fue mayor, ya que la distancia máxima obtenida mediante marcadores de secuencia entre estas dos especies fue de 4.2% mientras que nosotros hemos obtenido una distancia de 19.6%, demostrando así el mayor poder de resolución que podemos obtener mediante esta técnica. Los cebadores que generaron la mayor cantidad de sitios polimórficos fueron SAS1 (21) y SAS3 (22) en *M. capillaceus*, UBC 840 (11) en *M. popelairianus*, y SAS 1 (37) en el análisis de especies de *Megalobulimus*.

### ***Poder de resolución de las bandas (Rp)***

La capacidad de un cebador para distinguir entre un gran número de accesiones está representada por el poder de resolución (Rp) (Prevost y Wilkinson, 1999). Nuestros valores de Rp usando 6 cebadores ISSR, van desde 6.3 hasta 17.9 para el análisis de poblaciones de *M. capillaceus*, desde 12.14 hasta 20.25 para el análisis de poblaciones de *M. popelairianus* y desde 9.6 hasta 23.1 para el

análisis global de las 6 especies de *Megalobulimus*. Los cebadores con altos valores de Rp generalmente muestran un mejor rendimiento en la discriminación entre las accesiones. Nuestros resultados son comparables con los obtenidos por otros estudios que incluyen algunos de los cebadores que utilizamos, por ejemplo, los cebadores UBC 811 y UBC 823 fueron usados en especies de Jasmin por Ghasemi *et al.* (2014) obteniendo una Rp de 16.75, 19.55 respectivamente. Asimismo, Saki *et al.* (2016) usaron los cebadores UBC 811 y UBC 823 en poblaciones de *Descurainia sophia* obteniendo niveles de Rp de 15.9 y 9.64, respectivamente.

### **Contenido de Información Polimórfica (PIC)**

En este estudio, la medida de PIC estuvo en un rango de entre 0.44 y 0.50 en *M. capillaceus*, 0.34 y 0.49 en *M. popelairianus* y 0.36 y 0.46 en *Megalobulimus*. Los valores de PIC dependen del número de alelos detectables y la distribución de su frecuencia es equivalente a la diversidad genética. En marcadores dominantes, PIC tiene un límite máximo de 0.5 (De Riek *et al.*, 2001). Nuestros resultados son comparables a lo encontrado en la literatura, podemos tomar por ejemplo el estudio hecho por Ghasemi *et al.* (2014) con los cebadores UBC 811 y UBC823 que muestran niveles de PIC de 0.24 y 0.26 respectivamente. Asimismo, Saki *et al.* (2016) usaron los cebadores UBC 811 y UBC 823 en poblaciones de *Descurainia sophia* obteniendo niveles de 0.34 y 0.31 respectivamente.

### ***Reproducibilidad de la técnica***

La principal medida objetiva de calidad para evaluar la confianza de los marcadores ISSR y similares, es la replicación de todos los tratamientos (Pompanon *et al.*, 2005), esta es la principal diferencia con la información aportada por un marcador de secuencia, cuyos nucleótidos se pueden determinar con un alto grado de confianza. Es cierto que existen varias preocupaciones alrededor de los marcadores genéticos del tipo ISSR, RAPD y (otros similares) debido a su característica dominante, o posible omisión de homología o incluso problemas de reproducibilidad. En este estudio se ha tratado de detallar las condiciones de la parte experimental, a fin de demostrar robustez de los resultados usando marcadores ISSR en base a las recomendaciones de Tan y Ng (2015).

Para garantizar la reproducibilidad de la técnica de ISSR, es necesario que las réplicas de los experimentos, realizados bajo las mismas condiciones, obtengan los mismos perfiles. Dicho esto, todos nuestros experimentos fueron llevados a cabo utilizando los mismos equipos y el mismo protocolo para cada cebador, y obtuvimos bandas altamente reproducibles. Se ha conseguido una buena reproducibilidad en los perfiles ISSR de cada individuo reflejando el mismo patrón de bandas en diferentes reacciones de PCR usando los mismos cebadores, como se puede apreciar en los geles de electroforesis.

En cada reacción de PCR y electroforesis se incluyeron los individuos *M. capillaceus* de códigos W33 y W34 y en cada uno de los ensayos mostraron los mismos perfiles (casi a exactitud), por lo que se demuestra la repetitividad del método. Además, estas muestras cumplieron la función de control positivo ya

que se usó exactamente el mismo protocolo por cebador en los análisis de *M. popelairianus* y del género *Megalobulimus*. De esta manera se mantuvo la consistencia en toda la duración del estudio, a fin de garantizar la reproducibilidad y detectar cualquier error operacional.

Es preciso acotar que, aunque cada paso del protocolo estandarizado ha sido señalado en materiales y métodos, se podría esperar una pequeña variación en los resultados si los experimentos son realizados por otro equipo de investigación, incluso usando los mismos cebadores en las mismas especies (Ng y Tan, 2015), lo que podría deberse al uso de diferentes reactivos, diferentes ajustes a la PCR o diferentes criterios de puntuación de las bandas adoptadas según el investigador.

### ***Puntuación de bandas***

No todos los cebadores propuestos inicialmente entraron en el análisis, ya que varios de éstos no presentaron un perfil claro de amplificaciones. Las bandas manchadas pueden ser el resultado de la unión inespecífica de cebadores ISSR que causan una amplificación involuntaria, o la superposición de varias bandas con tamaños de fragmentos de ADN similares, lo que haría que la puntuación sea difícil e incoherente, esto pasó pocas veces en los perfiles de SAS1 de *M. popelairianus* y SAS3 de *M. capillaceus*. Se registraron solo las bandas con intensidades fuertes. El rango de tamaño de anotación estándar de las bandas obtenidas para los cebadores en estudio se encontró entre 250-1600 pb para *M. capillaceus*, muy similar al encontrado por Snegin *et al.* (2014) quienes

evidenciaron bandas en un rango de 200- 1500bp, y mostraron 18 loci para los cebadores SAS1 y UBC827, también en especies de caracoles terrestres.

### **7.3 Diversidad intraespecífica encontrada en *M. capillaceus***

Los estudios previos en *Megalobulimus capillaceus* (Congrains, 2010; Ramírez *et al.*, 2012; Borda, 2014; Ramírez *com. per.*) evaluaron la diversidad genética entre sus distintas poblaciones mediante marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA, sin embargo, los resultados mostraron nula diversidad genética, sin diferenciación haplotípica, en las secuencias. Además, las secuencias de *M. capillaceus* tampoco mostraron diferencias con las secuencias de *M. florezi* (Borda, 2011; Borda y Ramírez, 2013). Por ejemplo, el análisis poblacional de *M. capillaceus* realizado por Congrains (2010) no pudo evidenciar variación genética a pesar de trabajar con 31 secuencias de ADN. Además, *M. capillaceus* no es el único caso dentro del género en el que no se encontraron haplotipos al analizar poblaciones mediante marcadores de secuencia, esto también fue observado en otra especie con la que coincidentemente forma un grupo monofilético, *M. oblongus*. En un análisis poblacional con 28 secuencias de 16S rRNA y COI de individuos provenientes de diferentes departamentos y regiones de Colombia, se encontró un haplotipo único para todas las muestras (Jaramillo *et al.* 2014). En contraste, los análisis realizados en la presente tesis usando la técnica PCR-ISSR mostraron muchos sitios informativos útiles para evidenciar diversidad entre las poblaciones.

En primer lugar, se incluyeron muestras de Tingo María, únicas muestras colectadas fuera del departamento de San Martín, éstas se agruparon con un



nivel alto de soporte (100%) y se diferencian claramente de las poblaciones de San Martín. En cuanto a las demás localidades del departamento de San Martín, cabe destacar que Tarapoto y Juan Guerra se encuentran geográficamente cercanas entre sí, así como Huingoyacu y Huallaga, lo obtenido mediante los dendogramas por el método UPGMA revelan un clado con un buen nivel de soporte (83%) que agrupa tres de estas cuatro localidades del sur de San Martín (Juan Guerra, Huingoyacu y Tarapoto), mientras que el resto de las localidades pertenecientes al norte de San Martín (Moyobamba y Rioja) y la localidad restante del sur (Huallaga) se encuentran formando otro clado con bajo nivel de soporte en los nodos. Nuestros resultados en *M. capillaceus* muestran algún nivel de correspondencia entre la distribución poblacional y las distancias genéticas, lo que demostraría su utilidad en la caracterización de la diversidad intraespecífica en esta especie y sus relaciones con el ambiente en el que habitan.

Por lo cual, queda demostrado que, sí es posible encontrar estructura poblacional dentro de la especie mencionada, utilizando marcadores dominantes ISSR, lo cual refleja el poder de resolución de estos marcadores por sobre los marcadores clásicos de secuencia.

#### **7.4 Diversidad genética encontrada en *M. popelairianus sensu lato***

Como se presentó en los antecedentes (y se detalla en los anexos) Martens (1876) designó *M. popelairianus* var. *thammianus*, sin embargo, inicialmente no pudimos discriminarla de *M. popelairianus* ya que existen pocas claves taxonómicas que los distinguen, por lo que se asignó la identificación según la

población de procedencia (geográficamente cercanas entre sí y ubicados próximos al río Huallaga: *M. popelairianus* y los más lejanos: '*M. thammianus*'), sin embargo, esta asignación *a priori* no fue la más apropiada. En contraste a esto, los resultados de las amplificaciones empleando marcadores ISSR para las poblaciones de *M. popelairianus* mostraron perfiles electroforéticos que mantenían identidad con las únicas muestras de '*M. thammianus*' previamente identificadas en el laboratorio gracias a las características de la glándula pedial, lo que nos llevó a realizar análisis conchológicos más profundos y nombrar a todos estos individuos como *M. popelairianus sensu lato* rechazando la primera agrupación por localidades, ya que esa cercanía no predispuso alguna diferenciación entre las poblaciones.

A partir de la reasignación, la prueba de AMOVA (Excoffier et al., 1992) arrojó un porcentaje de variación del 85% entre las poblaciones, mientras que dentro de las poblaciones se observó un 15%, lo cual indica que *M. popelairianus sensu lato* presenta una clara estructuración poblacional, o que contendría dos unidades de diferenciación específica. Estos resultados se soportan también con la agrupación empleando el método UPGMA, para los individuos asignados como *M. popelairianus s.l.* muestran claramente dos clados (agrupaciones) y con niveles de soporte muy altos para cada uno (96 – 100%).

En los resultados de Ramírez *et al.* (2012) cuando genera filogenias para *Megalobulimus* empleando el marcador 16S rRNA se puede apreciar a '*M. thammianus*' formando un clado separado de *M. popelairianus*, aunque con una distancia genética menor entre estas dos especies (1.85% y 4.21%), la cual es menor a la distancia interespecífica promedio encontrada en otras especies de

este género (9.49% - 23.36%) empleando el mismo marcador molecular, dejando en duda el estatus taxonómico de esta sub especie.

Aunque, existen más indicios morfológicos que apoyan esta idea. Por ejemplo, uno de los caracteres diagnóstico para la identificación y evaluación filogenética del género *Megalobulimus* propuesto por Borda *et al.* (2010) es la glándula pedial, cuya morfología fue estudiada a detalle en moluscos terrestres, encontrando que en este género la glándula pedial es voluminosa y presenta un surco longitudinal medio (sinapomorfía para el género *Megalobulimus*), otro carácter observado en *Megalobulimus* es la presencia de un pequeño levantamiento a lo largo de la línea media del piso de la cápsula denominado "cresta" por Hylton-Scott 1939 (citado por Borda *et al.*, 2010). Esta glándula pedial en '*M. thammianus*' (longitud: 18.8 mm) no solo es diferente de *M. popelairianus* (longitud: 24.19 mm) en aspecto, sino que no presenta el levantamiento longitudinal encontrado en todas las demás especies de *Megalobulimus* estudiadas, en su lugar muestra un ligero engrosamiento en la línea media en su tercio anterior. Lo cual sugiere un nivel de diferenciación mayor que el limitado a una variedad de la especie *M. popelairianus*.

La colección de ejemplares tipo preservados en el MHN-UNMSM permitió re-evaluar un número de conchas mayor al de los individuos empleados en el presente estudio. Es así que, recopilando todas las claves taxonómicas descritas hasta el momento por Nyst (1845), Martens (1876) y Borda *et al.* (2010) (ver tabla 1), encontramos diferencias morfológicas considerables entre ambos grupos.

A pesar de que Martens (1876) ubicó a '*M. thammianus*' como una sub especie de *M. popelairianus*, son muchos los detalles tanto morfológicos como moleculares encontrados en la presente tesis que ponen en duda el estatus taxonómico de esta subespecie, pudiendo tratarse de una especie independiente. Nuestros resultados empleando marcadores ISSR y las nuevas claves taxonómicas aquí reunidas apoyan esta suposición.

Lo anterior respalda la utilidad de la técnica PCR-ISSR para distinguir grupos taxonómicos válidos, la distancia encontrada entre estos dos grupos es comparable a la distancia encontrada en otras dos especies ya definidas (*M. capillaceus* y *M. florezi*).

#### **7.5. Diversidad genética encontrada en el género *Megalobulimus***

El análisis de distancias sin correcciones mostró que la distancia entre poblaciones va desde 19.6 % a 37.1% de las 166 bandas mientras que las distancias máximas encontradas dentro de las especies iban desde 9.7% a 16.9%. Las distancias mostradas en este estudio fueron mayores a las obtenidas mediante marcadores de secuencia (Ramírez *et al.* 2012) y podría deberse a la cantidad de sitios informativos presentados, lo que indicaría que estos marcadores ISSR resultan útiles para obtener nueva información y mayor resolución a nivel interespecífico e intraespecífico.

Todas las topologías obtenidas por Ramírez *et al.* (2012) mediante los diferentes métodos de reconstrucción filogenética (Máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana) mostraron dos clados, uno con alto soporte

conformado por '*M. thammianus*', *M. popelairianus*, *M. huascari*, *M. separabilis* y, y otro de menor soporte conformado por *M. capillaceus* y *M. maximus*. Los análisis ISSR que realizamos muestran un patrón que va de acuerdo con lo mencionado, por un lado, tenemos un clado conformado por las especies *M. popelairianus*, '*M. thammianus*', *M. lichtensteini* y *M. carrikeri*, mientras que por otro lado tenemos un clado menos soportado conformado por *M. capillaceus* y *M. florezi*. Cabe mencionar que las topologías son similares también en cuanto a la formación de un clado muy bien soportado en el que se incluye *M. popelairianus* y '*M. thammianus*' y estos a su vez se encuentran relacionados con la especie basal *M. lichtensteini*.

Estudios previos en *Megalobulimus* mediante marcadores de secuencia mostraron una nula diversidad genética en *M. capillaceus* y poca diversidad (pero presencia de ella) en *M. popelairianus* (Congrains, 2010; Ramírez *et al.* 2012; Borda, 2014). Sin embargo, en este estudio se observó mayor cantidad de variación poblacional en *M. capillaceus* comparado a *M. popelairianus*, obteniendo en la primera 102 sitios de los cuales 100 eran polimórficos, mientras que en la segunda se obtuvieron solo 72 sitios de los cuales sólo 48 eran polimórficos. Esto está en concordancia con la distancia genética de las poblaciones analizadas ya que las poblaciones incluidas de *M. popelairianus* estaban restringidas a provincias cercanas, mientras que las poblaciones incluidas de *M. capillaceus* tomaban muestras de hasta dos departamentos diferentes (San Martín y Huánuco).

Además, se comparó el número de bandas obtenidas para las poblaciones de

*M. popelairianus* con el número de bandas derivadas de las poblaciones de *M. capillaceus* con los mismos marcadores. Se observó que, en total, se obtuvieron menos posiciones de bandas en *M. popelairianus* (72 sitios) con respecto a lo obtenido con *M. capillaceus* (104 sitios) y puede deberse a una característica propia de la especie y descartar algún error de la técnica. Esto también sirvió para validar la técnica ya que al repetir el mismo marcador y obtener los mismos resultados (*M. capillaceus*) refleja la reproducibilidad de los marcadores ISSR seleccionados para este estudio.

Por otro lado, los niveles de  $F_{st}$  por encima de 0.25 encontrados en todas las especies estudiadas corresponden a niveles muy altos de diferenciación genética (Tabla 16), lo que evidencia que estamos ante especies diferentes, incluso se puede evidenciar diferencias genéticas claras entre *M. capillaceus* y *M. florezi*, lo que no había podido ser evidenciado en estudios previos (Borda, 2014).

### ***Divergencia entre M. capillaceus y M. florezi***

Estas especies resultan interesantes de añadir a la comparación, ya que inicialmente fueron consideradas parte de la misma especie, esto basado en caracteres conchológicos. Borda y Ramírez (2013) demostraron la clara evidencia y soporte de *M. florezi* como especie independiente de *M. capillaceus*, basado en la genitalia y otros caracteres de la parte blanda. El análisis molecular realizado por Borda (2014) mediante marcadores COI y 16S rRNA no mostró diferencia genética entre ellas, por lo cual, el autor sostiene que podría deberse a una divergencia reciente. Sin embargo, nuestros análisis hechos mediante la

técnica ISSR han develado una distancia de 33% entre ambas, esta distancia es mayor a la distancia encontrada dentro de cada una de ellas: 14.1% en *M. capillaceus* y 12.5 en *M. florezi*.

Los resultados obtenidos muestran que el nivel resolutivo de la técnica ISSR es tan alto que puede revelar incluso variación dentro de las poblaciones de las especies de *Megalobulimus*. Todos los resultados dan soporte a los estudios morfológicos y análisis moleculares encontrados previamente en estos caracoles, y además proporcionan nueva información, lo cual pone en evidencia la gran utilidad de la técnica ISSR en especies cercanamente relacionadas, donde los marcadores de secuencia llegan a su límite de resolución.

## 8. CONCLUSIONES

- Los marcadores ISSR soportan las relaciones filogenéticas encontradas mediante los marcadores de secuencia y son idóneos para generar nueva información a un nivel taxonómico menor, por lo que el método ISSR-PCR representaría una eficaz herramienta para evidenciar la diversidad genética en especies cuya situación poblacional es difícil de resolver.
- Mediante el empleo de los marcadores ISSR, se corrobora la divergencia evidenciada en el complejo *popelairianus*, mostrando que dentro de *Megalobulimus popelairianus sensu lato* existen dos grupos claramente diferenciados mediante perfiles electroforéticos y análisis genéticos, soportando la hipótesis de que *Megalobulimus thammianus* es una especie propia e independiente de *Megalobulimus popelairianus*.
- Aunque no exista diferencia fenotípica evidente entre las poblaciones de *M. capillaceus*, los marcadores ISSR permiten observar diferencias genéticas entre ellas, lo que demuestra su utilidad en la caracterización de la diversidad intraespecífica.
- El empleo de cebadores del tipo ISSR develó diferenciación genética molecular al comparar las especies *M. capillaceus* y *M. florezi*, las cuales no habían presentado diferencias moleculares con otros marcadores, lo que demostraría su utilidad en la caracterización de la diversidad interespecífica.



- Se realizó con éxito la asignación de perfiles ISSR en las especies *M. carrikeri* y *M. lichtensteini*, estos perfiles varían muy poco dentro de las especies mencionadas y se diferencian ampliamente de los perfiles de otras especies de *Megalobulimus*.
- Los cebadores que mostraron mayor cantidad de sitios polimórficos útiles para el análisis en *M. capillaceus* fueron SAS 1 y SAS 3, en *M. popelairianus sensu lato* UBC 840, y en el análisis global entre especies de *Megalobulimus* fue SAS1.

## 9. RECOMENDACIONES

- Para designar a '*M. thammianus*' como una especie independiente, se recomienda un estudio morfológico detallado, ya que los datos moleculares encontrados con ISSR muestran divergencia, comparable a las distancias genéticas encontrada en otras especies como *M. carrikeri* y *M. lichteinsteini*.
- Al trabajar con ISSR se debe atender la validación y reproducibilidad de la técnica, por lo cual es necesario mostrar en detalle los métodos empleados, así como el protocolo detallado de reacción de cada PCR asociado con cada cebador. Para validar la técnica es necesario tomar al menos 5% de las muestras y ejecutar todos los experimentos por replicado.
- Los criterios utilizados para garantizar la confiabilidad del genotipado y la puntuación de las bandas deben ser lo más objetivo posible. Se recomienda el uso de softwares analizadores de gel, a fin de evitar el error humano al considerar loci ambiguos o contar doble.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adikwu M.U. & P.O. Nnamani. 2005. Some physiological and toxicological properties of snail mucin extracted from *Archachatina marginata*. *Bioresearch* 5: 1-6.
- Aitken E.A.B. & L.W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics Godwin, *Electrophoresis*, 18: 1524-1528.
- Almeida M. 2016. African snail: just an introduced species or a public health problem? *Acta Biomedica Brasiliensia*. 7 (2): 76 – 86.
- Arcade A., F. Anselin & P.F. Rampant, et al. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 299–307.
- Baby R. L., I. Hasan, K. A. Kabir, et al. 2010. Nutrient Analysis of Some Commercially Important Molluscs of Bangladesh. *J. Sci. Res.* 2 (2), 390-396.
- Bequaert J.C. 1948. Monograph of the Strophocheilidae a Neotropical family of terrestrial mollusks. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, 100 (1): 1-210, 32 pls.
- Blair M.W., O. Panaud & S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98, 780–792.
- Bornet B. & M. Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 19, pp. 209–215.
- Borda V., R. Ramírez, P. Romero. 2010. Glándula pediosa de moluscos terrestres y sus implicancias evolutivas, con énfasis en *Megalobulimus*. *Revista Peruana de Biología* 2010, 17 (1).
- Borda V. 2011. Especies de *Megalobulimus* (Mollusca, Megalobulimidae) con peristoma rojo del Perú: discriminación, estatus taxonómico y descripción de una nueva especie. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos
- Borda V. y Ramírez R. 2013. Re-characterization of the Red-lip *Megalobulimus* (Gastropoda: Strophocheilidae) from Peru with description of a new species. *Zoologia*. 30 (6): 675 – 691.
- Borda V. 2014. Patrones de polimorfismo molecular y morfológico de *Megalobulimus* (Mollusca, Gastropoda) en el sur de los Andes del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Borda V. & R. Ramírez. 2016. The Genus *Megalobulimus* (Gastropoda: Strophocheilidae) from Peruvian Andes: Re-Description of *Megalobulimus leucostoma* and Description of Two New Species. *American Malacological Bulletin*, 34(1), 15-27.
- Brooks T.M., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, et al. 2002. Habitat Loss and Extinction in the Hotspots of Biodiversity. *Conservation Biology*. 16: 909 – 923.
- Cano J., A. Rezusta M. Solé, et al. 2005. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. *J. Dermatological Sci.* 39: 17 – 21.
- Casu M., T. Lai, M. Curini-Galletti, et al. 2009. Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of ADN Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368: 147–152.
- Chirinos J. “Diversidad genética y estructura poblacional de *Megalobulimus huascari* (Gastropoda: megalobulimidae), especie promisorio del biocomercio nacional”. Asesora: Ramírez R. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología. Lima. 2012.
- Chueca L., B. Gomez-Moliner, M. Madeira, et al. 2018. Molecular phylogeny of *Candidula* (Geomitridae) land snails inferred from mitochondrial and nuclear markers reveals the polyphyly of the genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 118: 357 – 368
- Chuong T.T., A.H. Kenneth, R.H. Cowie. 2008. Lack of Mitochondrial ADN Diversity in Invasive Apple Snails (Ampullariidae) In Hawaii. *Malacology*, 50(1):351-357.
- Congrains C., J. Chirinos, R. Ramírez, et al. 2009. “Extremadamente baja diversidad genética de *Megalobulimus capillaceus* (Mollusca, Gastropoda) de la región de San Martín-Perú”. En: XVIII Reunión Científica ICBAR. Libro de Resúmenes. Lima, Perú. Agosto 2009. 71pp.
- Congrains C. “Ayudando a descifrar el enigma taxonómico, el código de barras de ADN de *Megalobulimus* spp. (Mollusca, Gastropoda) del Departamento de San Martín – Perú”. Asesora: Ramírez R. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología. Lima. 2010.
- Coppolino M. L., 2010. Strategies for Collecting Land Snails and Their Impact on Conservation Planning. *American Malacological Bulletin*, 28(2):97-103.
- Cossu P., G.L. Dedola, F. Scarpa, et al. 2015. Patterns of spatial genetic variation in *Patella ulyssiponensis*: insights from the western Mediterranean marine ecoregion. *Hydrobiologia*. 10.1007/s10750-015-2216-2.
- Davison A. 2002. Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Population Ecology*. 44: 129 – 136.

De Riek J., E. Calsyn, I. Everaert, et al. 2001. AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 1254–1265.

Doyle J.J. & J.L. Doyle J.L. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical. Bulletin* 19: 11-15.

Dong S., X. Shentu, Y. Pan, et al. 2011. Evaluation of genetic diversity in the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* (Lamarck), from different geographical populations in China by inter simple sequence repeat (ISSR). *African Journal of Biotechnology*. 10: 1777-1783.

El-Khayat H., K. Mahmoud, H. Abdel-Hamid, et al. 2015. Applications of inter simple sequence repeat (ISSR) rDNA in detecting genetic variations in *Lymnaea natalensis* snails from certain Egyptian Governorates. *African Journal of Biotechnology*. 14 (16): 1354 – 1363.

Etim L.B., C. Aleruchi & G.A. Obande. 2016. Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection. *British Microbiology Research Journal*. 11(2): 1-9.

Etukudo O., B. Asuquo, U. Ekaluo et al. 2018. Evaluation of genetic diversity in giant African land snails using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers. *Asian Journal of Advances in Agricultural Research*. 7 (2): 1 – 13

Excoffier, L., P. E. Smouse & J. M. Quattro. 1992. "Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data." *Genetics* 131 (2): 479–91.

Fagbuaro, O., J. A. Oso, J. B. Edward, et al. 2006. Nutritional status of four species of giant land snails in Nigeria. *Journal of Zhejiang University SCIENCE BSP*.

Felsenstein J. 1985 Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Folmer O., M. Black, W. Hoeh, et al. 1994. ADN cebadores for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.

García-Villacorta, R. 2009. Diversidad, composición y estructura de un hábitat altamente amenazado: los bosques estacionalmente secos de Tarapoto, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 16(1): 081- 092.

Ghasemi G., H. Salehi, M. Khosh-Khui, et al. 2014. Application of ISSR Markers to Analyze Molecular Relationships in Iranian Jasmine (*Jasminum* spp.) Accessions. *Mol Biotechnol* DOI 10.1007/s12033-014-9802-9

Gram C.H., J.L. Parra, C. Rahbek, et al. 2009. Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. *PNAS*. 106 (2): 19673–19678.

- Gupta M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson, et al. 1994. Amplification of ADN markers from evolutionarily diverse genomes using single cebadores of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet.* 89: 998 – 1006.
- Hamrick J.L. & M.J.W. Godt. 1990. Allozyme Diversity in Plant Species. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. and Weir, B.S., Eds., *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer, Sunderland. 43-63.
- Harris J. 1999. RAPDs in systematics a useful methodology? In: Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ eds. *Molecular systematics and plant evolution*. London: Taylor and Francis. 221–228.
- Holdridge L. R. 1947. Determination of World Plant Formations from Simple Climatic Data. *Science* 105:367-368.
- Idayachandiran G., A. Muthukumar, S. Kumaresan et al. 2014. Nutritional Value of Marine Bivalve, *Donax cuneatus* (Linnaeus, 1758) from Cuddalore Coastal Waters, Southeast Coast of India. 1:15-19.
- INEI. 2013. Anuario de Estadísticas Ambientales. [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1140/cap02.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1140/cap02.pdf)
- Jaramillo E., J. López, R. Ramírez, et al. 2014. Análisis morfológico del sistema reproductor e identificación molecular a través de los marcadores mitocondriales COI y 16 S rRNA de *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Strophocheilidae) de Colombia. *Revista Peruana de Biología.* 21 (1): 79 – 88
- Joshi S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, et al. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 1311–1320.
- Kebour, D., A. Boutekrabt, M. Mefti, et al. 2012. Use of the ISSR markers for the study of genetic polymorphism of the pistachio fruit *Pistacia vera* L. in Algeria. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science.* 74: 191 – 200.
- Khierallah H.S.M. 2015. Applications of Molecular Markers in Plant Genome Analysis and Breeding. 47-90
- Kumar S., G. Stecher & K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33 (7): 1870-1874.
- Larkin M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Laskowski R. & S. Hopkin. 1996. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): Implications for predators. *Environmental Pollution.* 91 (3): 289 – 297.
- Leme J. 1973. Neotropical Strophocheiloidea. *Arq. Zool. Mus. Zool. U. Sao Paulo* 23(5): 320-333.

- Librado P. & J. Rozas. 2009. ADNSP v5: A software for comprehensive analysis of ADN polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liew T-S. & M. Schilthuizen. 2016. A Method for Quantifying, Visualizing, and Analyzing Gastropod Shell Form. *Plos One* 11(6): e0157069.
- Lu Z., Y. Wang, Y. Peng, et al. 2006. Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern China revealed by ISSR markers. *Plant Science* 170: 407–412.
- Luo C., X. He, H. Chen et al. 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 39: 676 – 684
- Maddison W. P. & D.R. Maddison. 2001. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. version 0.98. <http://mesquiteproject.org>
- Maltagliati F., M. Casu, T. Lai, et al. 2005. Taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida: Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom*. 85(4): 835-841.
- Maltagliati F., T. Lai, M. Casu, et al. 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs).
- Mason C.F. 1970. Snail populations, beech litter production and the role of snails in litter decomposition. *Oecologia*. 5: 215 – 239.
- McCarthy C. 1996. Chromas: version 1.3. Griffith University, Brisbane, Australia.
- MINCETUR. 2008. Guía Artesanal Turística Perú.
- Myers N., R.A. Mittermeier, C.G Mittermeier, et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nei M., T. Maruyama & R. Chakraborty. 1975. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Society for the Study of Evolution*. 29 (1): 1 – 10
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583 – 590.
- Neiber M., O. Razkin & B. Hausdorf. 2017. Molecular phylogeny and biogeography of the land snail family Hygromiidae (Gastropoda: Helicoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 111: 169 – 184.
- Ng W.L. & Tan S.G. 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Science Journal*. 9(1): 30 – 39.
- Patwardhan A., R. Samit & A. Roy. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies- A Review. *Phylogenetics y Evolutionary Biology. J Phylogen Evolution Biol*. 2(2).

- Pereira P. M. C. C. & A. Vicente. 2013. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat science*. 93: 586-92.
- Prevost A. & M. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet*. 98: 107 –112.
- Ramírez R. & S. Cáceres. 1991. Caracoles terrestres (Mollusca, Gastropoda) comestibles en el Perú. *Boletín de Lima* (77): 67 – 74.
- Pompanon F., A. Bonin, E. Bellemain, et al. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*. 6(11): 847–859.
- Qiu Y., D. Hong & C. Fu. 2004. Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochem. Sys. Ecol*. 32: 583 – 596
- Ramírez R. y S. Cáceres. 1991. Caracoles terrestres (Mollusca, Gastropoda) comestibles en el Perú. *Boletín de Lima*. (77): 67-74.
- Ramírez R. 1993. A generic analysis of the family Systrophiiidae (Mollusca: Gastropoda): Taxonomy, Phylogeny and Biogeography. (M.A.) Thesis Systematics and Ecology, University of Kansas.
- Ramírez R., C. Paredes & J. Arenas. 2003. Moluscos del Perú. *Rev. Biol. Trop*. 51 (3): 225-284.
- Ramírez R. 2004. Sistemática e Filogeografia dos Moluscos do Ecosistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Peru. Doutorado em Zoologia. Faculdade de Biociências, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Ramírez R., V. Borda, P. Romero, et al. 2012. Biodiversidad y endemismo de los caracoles terrestres *Megalobulimus* y *Systrophia* en la Amazonia occidental. *Revista Peruana De Biología*, 19 (1).
- Ramírez R., V. Jimenez, V. Borda, et al. “Diversidad Gnética, código de barras de ADN y relaciones evolutivas de *Megalobulimus carrikeri* (Mollusca, Gastrópoda), endémica de Chanchamayo”. 2013. En: XXII Reunión científica. ICBAR, UNMSM. Lima, Perú. Agosto de 2013. p. 52.
- Ratnaparkhe M.B., M. Tekeoglu & F.J. Muehlbauer. 1998. Inter-simplesequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 515–519.
- Reddy K., J. Nagaraju & E. Abraham. 1999. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity*. 83: 681 – 687.
- Reddy M.P., N. Sarla, E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Rocha A., L. Salomão, T. Salomão, et al. 2011. Genetic Diversity of “Ubá” Mango Tree Using ISSR Markers. *Molecular Biotechnology*. 50 (2): 108 – 113.



- Roldán-Ruiz I., J. Dendauw, E.V. Bockstaele, et al. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* Spp). *Mol Breed* 6: 125–134.
- Roux O., M. Gevrey, L. Arvanitakis, et al. 2006. ISSR-PCR: tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Mol Phylogenetic Evolution*. 43 (1): 240 – 250.
- Saiki R. D., S. Gelfand, S. Stoffel, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of ADN with a thermostable ADN polymerase. *Science* 239: 487 - 491.
- Saki S., H. Bagheri., A. Deljou, et al. 2016. Evaluation of genetic diversity amongst *Descurainia sophia* L. genotypes by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. *Physiol Mol Biol Plants*. 22(1):97–105.
- Salimath S.S., A.C. de Oliveira, I.D. Godwin, et al. 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with ADN markers. *Genome* 38: 757–763.
- Sane A., A. Kareem, P.E. Rajasekharan, et al. 2012. Optimization of ADN Isolation and PCR Protocol for ISSR Analysis of *Nothapodytes nimmoniana*: A Threatened Anti-cancerous Medicinal Plant. *Asian Journal of Biotechnology*. 4: 100-107.
- Snegin E. 2014. Analysis of genetic variability in populations of a terrestrial snail *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata), based on the RAPD and ISSR markers. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 4(5): 444-454.
- Sedighi E. & M. Rahimmalek, M. (2015). Evaluation of genetic diversity of *Rubus hyrcanus* using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and morphological markers. *Biologia*. 70(3).
- Sneath P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: Freeman; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean. 230–234.
- Tagizad A., J. Ahmadi, R. Haddad, et al. 2010. A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for studying genetic diversity in Iranian pistachio cultivars. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 1 (1).
- Talekar N. & A. Shelton. 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*. 38: 275 – 301.
- Tryon G. 1876. *Manual of conchology; structural and systematic. With illustrations of the species. Second series: Pulmonata*.
- Uit de Weerd D. y E. Gittenberger. 2013. Phylogeny of the land snail family Clausiliidae (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67 (1): 201 – 216
- Virk P.S., J. Zhu, H.J. Newbury, et al. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112: 275–284.

- Wade C., Mordan B. & Naggs F. 2006, Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society*. 87: 593–610.
- Walsh P., H. Erlich & R. Higuchi. 1992. Preferential PCR amplification of alleles: Mechanisms and solutions. *PCR Methods and Applications*. 1: 241 – 250.
- Wallace R.B., Shaffer J., R.F. Murphy, et al. 1979. *Nucleic Acids Res.* 6: 35-43.
- Wiens J. 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Syst. Biol.* 53 (4): 653 – 661.
- Wolfe A.D. & A. Liston. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plant. II. ADN sequencing*. Chapman and Hall, Newyork. 43–86.
- Wolfe A.D. & Randle C.P. 2001. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Systematic Botany*.
- Wu W., Y.L. Zheng, L. Chen, et al. 2005. Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 1141–1157.
- Yang J., L. Tian, B. Xu, et al. 2015. Insight into the Migration Routes of *Plutella xylostella* in China Using mtCOI and ISSR Markers. *PLoS ONE* 10(6): e0130905.
- Yeh F.C., R.C. Yang, T. Boyle. 1999. POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta.
- Yi Q., S. Yi, T. Quin, et al. 2017. Using RAPD and ISSR Molecular Markers to Analyze the Genetic Diversity of Rose scented *Pelargonium* Populations. *Flavour and Fragrance Journal*. 33 (1): 75 – 81.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, & D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176 - 183.

## 11. ANEXOS Y GLOSARIO

### Datos morfológicos más resaltantes recopilados de la descripción original de *Megalobulimus*

Transcripción de la **descripción original** Fragmento (Página 14-15)- *University of California Libraries (archive.org)*:

***Megalobulimus popelairianus* típico Nyst, 1845.** Último giro pardo rojizo oscuro sin malleación, apertura ligeramente superior a la mitad de la longitud de la cáscara. Sin tubérculo en la pared parietal.

**Variación *thammianus* Martens, 1876.** Último giro pardo amarillento oscuro con numerosas malleaciones; una banda amarilla clara en la sutura; pérdida de cutícula en manchas o en rayas, raramente en zigzag. Apertura de tamaño de la mitad de la longitud de la conchilla, con un tubérculo calloso encima en la pared parietal. Labio de bordes amarillo.



Izquierda: *Megalobulimus popelairianus* típico (Plate 1 Fig 1 del libro). Derecha: *M. popelairianus* var. *thammianus* Martens 1876 (Plate 9 Fig 49 del libro). Tomado de Tryon G. (1895-6)

## GLOSARIO

Alelo:	Forma alternativa de un locus genético. Para un único marcador (locus), los alelos positivo y nulo, aunque diferentes, se consideran homólogos (es decir, poseen un origen evolutivo común). Cuando el término "alelo" se usa a través de diferentes marcadores (por ejemplo, para referirse a cualquier fragmento visualizado), debe quedar claro que estos alelos se derivarán de diferentes loci, y por lo tanto serán en su mayoría no homólogos.
Alelo nulo:	Para un marcador dado, es el alelo inferido cuando la banda está ausente.
Alelo positivo:	Se muestra como un fragmento de ADN amplificado (visualmente puede referirse como banda o pico).
Banda o pico:	Fragmento de ADN visualizado en un perfil electroforético o <i>fingerprint</i> (un alelo positivo). 'Banda' se aplica generalmente a un fragmento visualizado usando un sistema basado en gel, y 'pico' a un fragmento visualizado usando un sistema fluorescente.
Caracter:	Un marcador que se puntúa en múltiples individuos y se incluye en la matriz de datos. Para ISSR, hay dos posibles estados de caracter: '1' (presente en un individuo, alelo positivo) o '0' (ausente en un individuo, alelo nulo).
Marcador:	Empleando la técnica PCR-ISSR un marcador es considerado un locus amplificado que se identifica como bandas de igual tamaño en múltiples muestras. Un marcador debe ser polimórfico (es decir, mostrar los alelos positivo y nulo) para ser informativo. De modo que, a través de todas las muestras, los fragmentos visualizados de movilidad aproximadamente igual se tratan como alelos homólogos derivados de un único locus).
Marcador dominante:	Marcador que se califica como un alelo presente (positivo) o ausente (nulo). Los marcadores dominantes no pueden distinguir los estados homocigotos (AA) y heterocigotos (Aa): una banda está presente en ambos casos.

Fragmento:	Un producto de la amplificación mediante la técnica PCR-ISSR. Dependiendo del tamaño y la cadena, no todos los fragmentos se visualizarán como picos o bandas.
Locus ( <i>loci pl.</i> ):	Una región específica del cromosoma que corresponde a la posición de un marcador; también el ADN en esa posición.
Homoplasia	La homoplasia ocurre cuando, por casualidad, los alelos no homólogos de igual movilidad caen en la misma posición y, por lo tanto, se tratan como un único marcador. En algunos casos, puede haber dos o más marcadores en una huella dactilar que se derivan de un único locus (por ejemplo, un microsatélite variable). Aunque estos marcadores deben tratarse como un único marcador codominante, a menudo esto no es posible en este tipo de análisis.
Perfil electroforético o <i>fingerprint</i> :	Conjunto completo de bandas ISSR visualizadas para una muestra determinada. Aquí consideramos ' <i>fingerprint</i> ' y 'perfil' como sinónimos, pero el primero se utiliza a veces en un sentido más estricto, cuando el patrón de bandas identifica de forma única a un individuo
<i>Sensu lato</i>	<i>lat.</i> o <i>s.l.</i> - en el sentido amplio. Se utiliza en taxonomía para aclarar el alcance de un taxón cuando se ha utilizado para definir más de un conjunto de taxones de nivel inferior.